

**Der Malonyl-CoA-Gehalt der Rattenleber und der
Bäckerhefe unter verschiedenen Stoffwechsel-
bedingungen**

Ernst-Christoph Foerster

1979

DER MALONYL-COA-GEHALT DER RATTENLEBER UND BÄCKERHEFE
UNTER VERSCHIEDENEN STOFFWECHSELBEDINGUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt

von

Ernst-Christoph Foerster

München

1978



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.3.1979

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1976 bis November 1978 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. F. Lynen am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, ausgeführt.

Herrn Professor Dr. F. Lynen danke ich sehr herzlich für sein förderndes Interesse und seine Unterstützung, die er dieser Arbeit und mir persönlich jederzeit zuteil werden ließ.

Frau B. Wühr danke ich für ihre fleissige Mitarbeit seit November 1976.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern der Abteilung von Professor Lynen, Max-Planck-Institut für Biochemie, und Herrn Dr. E. Siess für wertvolle Anregungen und ständige Hilfsbereitschaft.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Ergebnisse	7
2.1	Verfahren zur Malonyl-CoA-Bestimmung in Rattenlebern	7
2.2	Untersuchung der NADPH-Seiten-spezifität von Hefe-Fettsäure-synthetase	8
2.3	Enzymatische Synthese von (4S)-4- ³ H-NADPH (B- ³ H-NADPH) hoher spezifischer Radioaktivität	10
2.4	Untersuchung zum unvollständigen Einbau des Tritiumwasserstoffs aus B- ³ H-NADPH in Fettsäuren	13
2.5	Untersuchungen der Fettsäurenkettenlänge, die unter den Bedingungen des radiochemischen Malonyl-CoA-Testes entstehen	23
2.6	Gehaltsbestimmung von Malonyl-CoA in der Rattenleber und Bäckerhefe	26
2.7	Der Malonyl-CoA-Spiegel der Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen	32
2.7.1	Tag- und Nachtrhythmus	32
2.7.2	Hunger	33
2.7.3	Alloxandibabetes	35
2.7.4	Kohlenhydratfütterung	36
2.7.5	Fettfütterung	38
2.7.6	Alkohol und Fettfütterung	38
2.7.7	Proteinfütterung	43

	Seite
2.8 Der Malonyl-CoA-Gehalt der Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cere-</i> <i>visiae</i>) unter verschiedenen Stoff-	
wechselbedingungen	43
2.8.1 Substratverarmung	44
2.8.2 Glucose	44
2.8.3 Alkohol und Acetat	46
2.8.4 Oktan-, Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Linol-, Linolensäure	48
2.8.5 Palmitin-, Stearin-, Linol-, Linolensäure und Glucose	50
3. Zusammenfassende Diskussion	55
4. Experimenteller Teil	63
4.1 Geräte	63
4.2 Substanzen	64
4.3 Allgemeine analytische Methoden	65
4.3.1 Proteinbestimmung	65
4.3.2 Radioaktivitätsmessung	65
4.4 Ratten und Standarddiät	66
4.5 Isolierung und Aktivitätsbestim-	
mung von FSS	66
4.6 Seitenspezifität der Hybridüber-	
tragungsreaktion der Fettsäure-	
synthetase aus Hefe	67
4.7 Enzymatische Synthese von (4S)-4-	
³ H-NADPH aus D-1- ³ H-Glucose zur	
radiochemischen Malonyl-CoA-	
Bestimmung	68
4.8 Reinigung des (4S)-4- ³ H-NADPH	68
4.9 Bildung tritierter Fettsäuren	
aus Malonyl-CoA, Acetyl-CoA, FSS	
und aus - aus D-1- ³ H-Glucose	
dargestelltem - B- ³ H-NADPH	71

	Seite
4.10 Mischung aus ^{14}C -Palmitinsäure- lösung zur Extraktionsstandardi- sierung und aus unmarkierten Fett- säuren als Extraktionsträger	71
4.11 Eichungen des radiochemischen Tests zur Bestimmung der Malonyl- CoA-Konzentration in Rattenleber- und Bäckerhefe-Homogenaten	72
4.12 Bestimmung der Extraktionsausbeuten für geradzahlige Fettsäuren von C_6 bis C_{18}	72
4.13 Enzymabhängigkeit der Bildung tritierten Wassers aus $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ mit nativer FSS	73
4.14 Darstellung von FMN-freier FSS	73
4.15 Reaktivierung FMN freier FSS	74
4.16 Tritiumwasserbildung aus $\text{B-}^3\text{H-NADPT}$ mit FMN-freier FSS	74
4.17 Inkubation von FMN mit $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$	75
4.18 Tritiumwasserbildung bei der kompletten Fettsäuresynthetase-reaktion	75
4.19 Radiogaschromatographie	75
4.20 Endproduktverschiebung durch Variation der Acetyl-CoA-Konzentra- tion	77
4.21 Zur Gehaltsbestimmung von Malonyl- CoA in der Rattenleber und Bäcker- hefe	78
4.22 Acetyl-CoA-Abbau der Leber- und Hefehomogenate	79
4.23 Zersetzung von Malonyl-CoA beim Acetyl-CoA-Abbau in Gewebekomogenaten	79

	Seite
4.24 Perchlorsäureextraktionsoptimum und Wiederfindungsraten von Rattenleber- und Hefehomogenaten	80
4.25 Stabilität von Malonyl-CoA in verdünnter Perchlorsäure	81
4.26 Messung des NADPH-Gehalts im neutralisierten Gewebeextrakt	81
4.27 Radiochemische Acetyl-CoA-Bestimmung	81
4.28 Berechnung der Malonyl-CoA-Konzentration in Rattenleber- und Hefehomogenaten	83
4.29 Zu Kap. 2.7 (Der Malonyl-CoA-Gehalt der Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen)	85
4.29.1 Bestimmung der Glucose und von Alkohol im Blut	85
4.29.2 Tag- und Nachtrhythmus der Ratten	85
4.29.3 Gehungerte Ratten	86
4.29.4 Alloxandibetische Ratten	86
4.29.5 Zusammensetzung und Herstellung der Diäten	88
4.29.6 Vitaminmischung	89
4.29.7 Salzmischung	89
4.29.8 Fütterung	89
4.29.9 Alkohol- und Fettfütterung	91
4.30 Der Malonyl-CoA-Gehalt der Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen	93
4.30.1 Substratverarmung	93
4.30.2 Glucose	93

	Seite
4.30.3 Alkohol und Acetat	94
4.30.4 Oktan-, Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Linol- und Linolensäure	94
4.30.5 Hitzeinaktivierung der Hefe	95
4.30.6 Inkubation verarmter Hefe mit Fettsäuren und Glucose	95
5. Zusammenfassung	97
6. Literaturverzeichnis	100
7. Lebenslauf	110

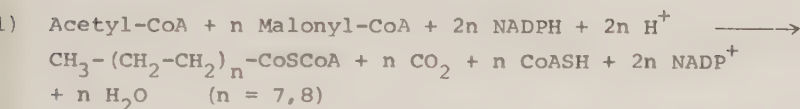
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adosintriphosphat
Ci	Curie
cpm, CPM	Gezählte Zerfälle pro Minute
CoA, CoASH	Coenzym A
CS	Citratsynthase
d	Tage
DTT	Dithiothreitol
dpm, DPM	Desintegrationen pro Minute (echte Zerfälle)
E, mE	Enzymeinheit, - millieinheit
FMN	Flavinmononucleotid
FMNH ₂	Flavinmononucleotid, reduziert
FSS	Fettsäuresynthetase
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GSSG	Glutathion, oxidiert
h	Stunden
HK	Hexokinase
I.E.	Internationale Einheiten
K-PO ₄	Kalium-Phosphat-Puffer (angegebene Molarität gilt für Phosphat)
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
min	Minuten
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat, reduziert

NADPT	in Position 4 des Nicotinamidrestes tritiiertes NADPH
NPGS	Neopentyl-glykolsuccinat
POPOP	1,4-Bis-2-(5-phenyloxazol)-benzol
sec	Sekunden
T	Temperatur, Tritium
U	Enzymeinheit
UPM	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen, Geschwindigkeit

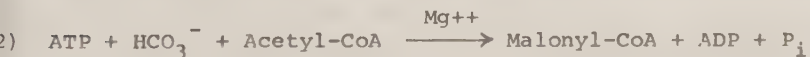
1. Einleitung

Die Biosynthese langkettiger Fettsäuren verläuft gemäß folgender Gesamtgleichung (1):



Produkte der Synthese sind in Hefe Palmitoyl- und Stearoyl-CoA, in tierischen Geweben und in Pflanzen dagegen die freien Fettsäuren (2,3,4). Der gesamte Syntheseprozess wird in Hefe (1,5,6), in anderen Pilzen (7,8), sowie in Tieren (9,10,11,12,13) durch den Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase katalysiert, während in Bakterien (14) und in Pflanzen (15) die Teilreaktionen des Syntheseprozesses von dissoziiert vorliegenden Einzelenzymen übernommen werden.

Die Funktion des Malonyl-CoA als Lieferant von C_2 -Bausteinen für die Fettsäuresynthese wurde zuerst von Lynen (16) vorgeschlagen und experimentell von Wakil (17) und Brady (18) bewiesen. Katalysiert von dem Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase (EC. 6.4.1.2) wird es nach folgender Gleichung synthetisiert:



Die Fettsäuresynthetase und Acetyl-CoA-Carboxylase sind Bestandteile des cytoplasmatischen Raumes. Da Malonyl-CoA keine weiteren Stoffwechselfunktionen erfüllt, ist die Acetyl-CoA-Carboxylase-Reaktion der erste spezifische, zur Fettsäuresynthese führende Schritt: (Tabelle 1);

Bei alloxandiabetischen Ratten ist die Aktivität des citratspaltenden Enzyms ebenfalls erniedrigt (28,29), kann aber durch Gabe von Insulin wiederhergestellt werden (28,30). Alle diese Änderungen der Aktivität des citratspaltenden Enzyms stimmen mit den Änderungen der Fettsäuresynthese überein und unterstützen den Standpunkt, daß diesem Enzym regulatorische Funktionen bei der Fettsäuresynthese zukommen.

Neuere Arbeiten aus der Gruppe um Srere stellen allerdings die Rolle des citratspaltenden Enzyms bei der Fettsäuresynthese in Frage (31,32). Sie konnten zeigen, daß in Rattenleberschnitten von nach Hunger wieder gefütterten Tieren die Fettsäuresynthese wesentlich schneller ansteigt, ohne daß davon der Spiegel des citratspaltenden Enzyms berührt wird. Ebenso fällt bei Gabe von Alloxan trotz gesunkener Fettsäuresynthese das Niveau des citratspaltenden Enzyms zunächst nicht ab. Diese Untersuchungen wurden jedoch unter Bedingungen der Kurzzeitkontrolle der Fettsäuresynthese durchgeführt, wobei die Regulation vor allem durch Änderungen der katalytischen Aktivität und weniger durch Änderungen der Enzymmenge bewerkstelligt wird, da die Halbwertszeit für den Abbau des Enzyms 14-27 h beträgt (27).

Auch die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase schwankt parallel zu Änderungen der Fettsäuresynthese bei verschiedenen Ernährungs-, Hormon-, Entwicklungs- und genetischen Bedingungen. Der Carboxylasespiegel in der Rattenleber (33,34,35,36) und im Fettgewebe (37) ist bei Hunger erniedrigt und bei Wiedorfütterung der gehungerten Tiere wiederhergestellt. Wiedorfütterung gehungelter Tiere mit fettfreier Diät läßt den Enzymspiegel schneller ansteigen als bei einer ausgeglichenen Diät (35,36). Auch die enterale Gabe von Fetten senkt den Carboxylasegehalt von Tieren, die mit einer fettfreien Diät gefüttert wurden (38,39). Alloxandibetes wird von einem Abfall des Carboxylasespiegels in der Rattenleber (40), wie auch im Fettgewebe (37) begleitet.

Wie beim citratspaltenden Enzym werden auch bei der Acetyl-CoA-Carboxylase Änderungen der Aktivitäten von den analogen Schwankungen der Fettsäuresynthese bei den verschiedenen Stoffwechselsituationen begleitet. Mit immunchemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die katalytische Effektivität pro Carboxylase-Molekül bei den verschiedensten Stoffwechselbedingungen, die mit einer gesteigerten oder gebremsten Fettsäuresynthese in der Rattenleber verbunden sind, unberührt bleibt (41,42,43,44,45). Aus diesem Befund ergibt sich die Notwendigkeit, daß die Änderungen der Carboxylase-Aktivität in Leberextrakten mit Änderungen der Enzymmenge verknüpft sein müssen. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten Experimente konnten bei normal gefütterten, gefasteten, fettfrei wiedergefütterten und alloxandiabetischen Tieren (43,44,42) zeigen, daß bis auf die gefasteten Tiere die Halbwertszeit der Carboxylase ($t_{1/2}=55-59$ h) gleich blieb, die Änderungen im Carboxylasegehalt also auf veränderte Synthesegeschwindigkeiten zurückzuführen sind. Bei den gefasteten Tieren zeigte sich ein gesteigerter Abbau sowie eine verminderte Synthese des Carboxylase-Enzyms, da ja im Hungerzustand Lebergewicht und Enzymgehalt der Leber abnehmen.

Zu der oben beschriebenen Regulation der Fettsäuresynthese durch Änderungen der Acetyl-CoA-Carboxylase-Menge (Langzeitkontrolle) existiert noch eine weitere wirksame Synthesekontrolle durch die katalytische Aktivität des Enzyms. So sind für die Acetyl-CoA-Carboxylase tierischen Ursprungs mehrere positive und negative Effektoren bekannt, deren Eingreifen sich innerhalb weniger Minuten bemerkbar machen kann (Kurzzeitkontrolle): Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Citrat ein Vorläufer des Acetyl-CoA ist, leuchtet es ein, daß Citrat wie andere Tri- und Dicarbonsäuren als Aktivator der Carboxylase wirkt (46,47,48). Die "in vivo"-Hemmung der Carboxylase in Rattenleber und in Hefezellen durch langkettige Acyl-CoA-Thioester (87,49,50,51) und durch Malonyl-CoA (48,52,53,54) kann als Produkthemmung angesehen werden.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Regulation der Fettsäuresynthese möglicherweise auch bei der Fettsäuresynthetase selbst ansetzt oder durch Vermehrung oder Verringerung einer ihrer Substrate gesteuert wird, wurden ebenfalls Untersuchungen vorgenommen. Das von der Fettsäuresynthetase benötigte NADPH wird zum einen von den Hexosemonophosphatdehydrogenasen und durch den Pentosephosphatcyclus (56, 57, 58) im Cytoplasma, zum anderen durch Transhydrogenierungs-Mechanismen des Hydridions von NADH auf NADP^+ (55) unter Mitwirkung der Malatdehydrogenase und dem "malic enzyme" (Malat-Dehydrogenase, decarboxylierend; NADP) bereitgestellt. Wiederum gleichen sich die Hexosemonophosphatdehydrogenasen (55, 59, 60-70) und das "malic enzyme" (55, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 70, 71, 72, 73) in der Rattenleber und im Fettgewebe den verschiedenen ernährungsphysiologischen und hormonellen Voraussetzungen ebenso an, wie die Fettsäuresynthese unter diesen Bedingungen schwankt. Die den verschiedenen Stoffwechselbedingungen angepaßten Änderungen dieser Enzym Spiegel kommen ebenfalls durch veränderte Enzymsynthesen zustande (27, 74, 75, 76).

Von der Fettsäuresynthetaseaktivität in der Rattenleber ist bekannt, daß ihre verschiedenen Aktivitäten den unterschiedlichen Stoffwechselsituationen, die zu sich ändernden Fettsäuresyntheseraten führen, angepaßt sind (35, 36, 70, 77, 78, 79, 80, 81). Auch hier konnte mit dem gereinigten Rattenleberenzym gezeigt werden, daß die Enzymsynthese nach Wiederfütterung von gehungerten Tieren mit fettfreier kohlenhydratreicher Diät angekurbelt wird (82, 83) und dabei in 12-72 h auf das 4-bis 14-fache ansteigt (27, 85). Bei gehungerten Tieren ist die Enzymsynthese gegenüber den Kontrolltieren um 20 % verringert (84, 85).

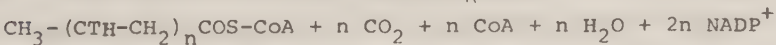
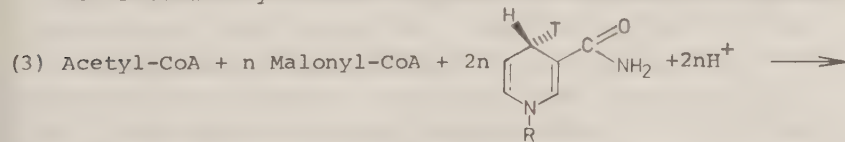
Das Zusammenspiel der verschiedenen Effekte hat Numa (86) an Leberschnitten zeigen können: Bei Ratten, die nach 48 h Hunger mit einer fettfreien, kohlenhydratreichen Diät gefüttert wurden, zeigte sich, daß die Fähigkeit zur Fettsäuresynthese sehr viel rascher zunimmt, als der Gehalt an Acetyl-CoA-Carboxylase, und zusammenfällt mit dem Anstieg des positiven Effektors Citrat und dem gleichzeitigen Absinken des negativen Effektors, den langkettigen Acyl-CoA-Thioestern.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die koordinierten Schwankungen der Fettsäuresynthese in Rattenleber und Hefezelle bei einer Vielzahl von metabolischen Bedingungen mit Malonyl-CoA, dem Produkt der Acetyl-CoA-Carboxylase, bzw. dem Substrat der Fettsäuresynthetase, zu erfassen. Als Grundlage dazu soll über ein neues, empfindliches Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Malonyl-CoA berichtet werden.

2. Ergebnisse

2.1 Verfahren zur Malonyl-CoA-Bestimmung in Rattenlebern

Malonyl-CoA wurde in verschiedenen Rattenleberhomogenaten und isolierten Rattenhepatocyten von Veech (88,89) mit einem optischen Test gemessen, wobei er für normal gefütterte Tiere ca. 13-15 nmol Malonyl-CoA und für gehungerte Tiere 4 nmol Malonyl-CoA pro Gramm feuchte Leber angab (88,90); später veröffentlichte er für mit Kohlenhydraten gefütterte Ratten 37,8 nmol Malonyl-CoA/g feuchte Leber (91). Bei frisch isolierten Ratten-Hepatocyten fand er 5 nmol/g feuchte Zellen (92); durch Substratzusatz konnte er den Malonyl-CoA-Gehalt der Zellen auf 14,8 nmol/g Feuchtgewicht steigern. Bei unseren Versuchen zeigte sich jedoch, daß der optische Test mit einer Nachweisempfindlichkeit von 2 nmol die wahren Verhältnisse einer gebremsten Fettsäuresynthese der Rattenleber und Hefezelle nicht erfassen kann. Zur radiochemischen Bestimmung von Malonyl-CoA kann man sich die Möglichkeit zunutze machen, durch Umsetzung dieser Substanz mit Acetyl-CoA und in 4-Stellung tritiiertem NADPH radioaktiven Wasserstoff katalysiert von der Fettsäuresynthetase aus Hefe in Fettsäuren einzubauen:



Auf die in Gleichung 3 angegebene Stereospezifität des Tritiumeinbaus wird im folgenden Kapitel eingegangen.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur Malonyl-CoA-Bestimmung auf Grundlage dieser spezifischen Umwandlung.

Dazu konnten folgende Voraussetzungen erfüllt werden:

- 1) Der Einbau von Radioaktivität aus NADPT war linear abhängig von der spezifischen Radioaktivität des verwendeten NADPT, d.h. die verwendete Substanz war rein.
- 2) Die Aktivität der Fettsäuresynthetase war hoch genug, um eine Umsetzung in einer der Empfindlichkeit der Substrate angemessenen Zeit zu ermöglichen.
- 3) Die Enzympräparation katalysierte keine weiteren Malonyl-CoA verbrauchenden Nebenreaktionen.
- 4) Die tritierten Fettsäuren konnten in genügender Ausbeute, reproduzierbar und frei von radioaktiven Begleitsubstanzen durch Petrolätherextraktion aus der Inkubation isoliert werden.

2.2 Untersuchung der NADPH-Seitenspezifität von Hefe-Fettsäuresynthetase

Die Umsetzung von käuflichem $4\text{-}^3\text{H-NAD}^+$ mit ATP in Gegenwart von NAD-Kinase führt zu $4\text{-}^3\text{H-NADP}^+$ (93). Nach Siedel (94) kann Letzteres anschließend mit G-6-P und G-6-P-Dehydrogenase zu $(4R)\text{-}4\text{-}^3\text{H-NADPH}$ ($= A\text{-}^3\text{H-NADPH}$) oder mit Isocitrat und Isocitratdehydrogenase zu $(4S)\text{-}4\text{-}^3\text{H-NADPH}$ ($= B\text{-}^3\text{H-NADPH}$) reduziert werden. Aliquote dieser beiden seitenspezifischen NADPT-Lösungen wurden in zwei parallelen Versuchsreihen mit Acetyl-CoA, Fettsäuresynthetase und steigenden Mengen Malonyl-CoA inkubiert. Nach der Petrolätherextraktion zeigte sich, daß Radioaktivität nur aus $B\text{-}^3\text{H-NADPH}$ in Fettsäuren eingebaut wurde, nicht jedoch aus $A\text{-}^3\text{H-NADPH}$ (Abb. 1):

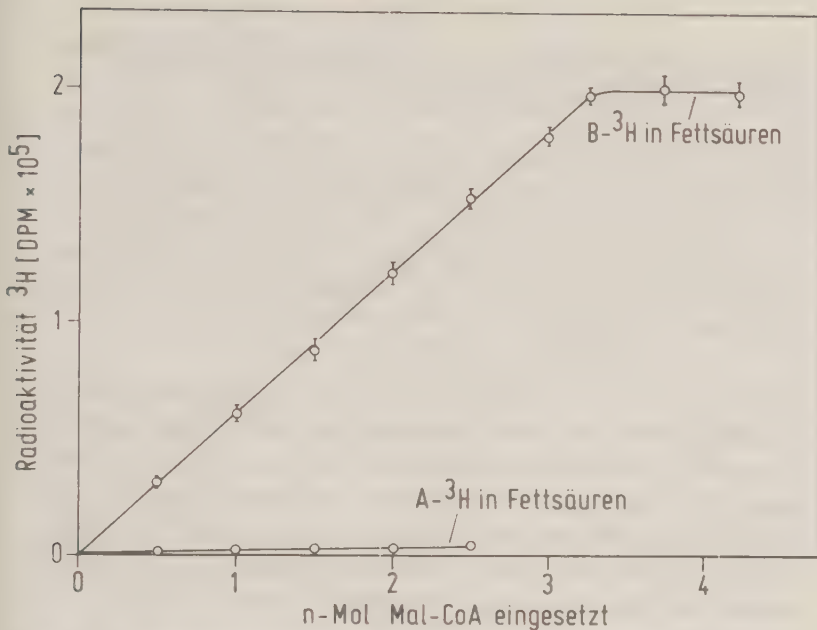


Abb. 1: Seitenspezifität der Fettsäuresynthetase in
bezug auf die 4-Position des NADPH.
(Exp. Einzelheiten s. S. 67)

Dieser Befund deckt sich mit dem von Wakabayashi (95) und mit dem von Seyama et al. (96) gefundenen. Keine Übereinstimmung mit der Arbeit von Seyama et al. (96) wurde erzielt, als, wie in Kap. 2.4 beschrieben, die Stöchiometrie der Fixierung radioaktiven Wasserstoffs aus $\text{B-}^3\text{H}$ -NADPH in Fettsäuren durch Hefe-Fettsäuresynthetase untersucht wurde. Seyama et al. veröffentlichten, daß aus dem in 4-Position deuteriertem B-NADPH je zwei Wasserstoffatome pro C_2 -Einheit an die ungeradzahigen Methylen-Kohlenstoffatome der Fettsäuren fixiert werden. Wir fanden jedoch, daß nur 0.75-0.90 Tritiumatome an die C_2 -Bausteine der Fettsäuren gebunden werden konnten. Als Erklärung dazu führen wir die in Kap. 2.4 behandelten Experimente an, die zeigen, daß über das bei der Enoyl-Reduktion beteiligte FMN Tritiumwasserstoff des NADPH mit Wasser ausgetauscht werden kann.

2.3 Enzymatische Synthese von (4 S)-4-³H-NADPH (B-³H-NADPH) hoher spezifischer Radioaktivität.

Da die spezifische Radioaktivität des nach (94) dargestellten B-³H-NADPH nicht ausreichte, um auch Malonyl-CoA-Mengen unter 0,5 nmol pro Inkubation nachweisen zu können, wurde ein neues Verfahren entwickelt, das B-³H-NADPH in einer bis zu 60-fach höheren spezifischen Radioaktivität lieferte:

NADP⁺ ließ sich mit käuflicher D- (1-³H)-Glucose (4-8,3 Ci/nmol), ATP und einer Enzymmischung aus Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu ca. 65 % reduzieren. Unter den Inkubationsbedingungen war allerdings ein nahezu quantitativer Umsatz erwartet worden. Auch ein bis zu dreifacher ATP und NADP⁺-Überschuß gegenüber der Glucose konnte die Ausbeute nicht verbessern (Abb. 2):

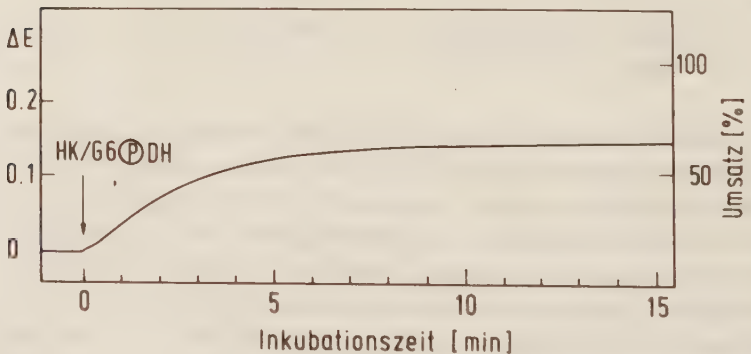


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der enzymatischen B-³H-NADPH-Synthese aus NADP⁺ und 1-³H-Glucose bei ATP-Überschuß.

Bedingungen: 75 μM NADP⁺, 37,5 μM 1-³H-Glucose (4-8,3 Ci/nmol), 60 μM ATP, 4 mM MgSO₄, V=0,75 ml, pH = 7,5, T = 25° C.

Hinweise auf eventuelle Inhibitoreigenschaften der einzelnen Reaktionspartner wie ATP, ADP, Puffer, NADP^+ , usw., auf die NADPH-Bildung konnten nicht erhalten werden. Auch konnte die Inkubationsausbeute bei Verwendung von 98 %igem NADP^+ nicht gesteigert werden. Wurde dieses $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ hoher spezifischer Radioaktivität unverdünnt zu steigenden Mengen Malonyl-CoA und konstanten Mengen Acetyl-CoA mit Fettsäuresynthetase aus Hefe inkubiert, erhielt man den in Abb. 3 wiedergegebenen Verlauf:

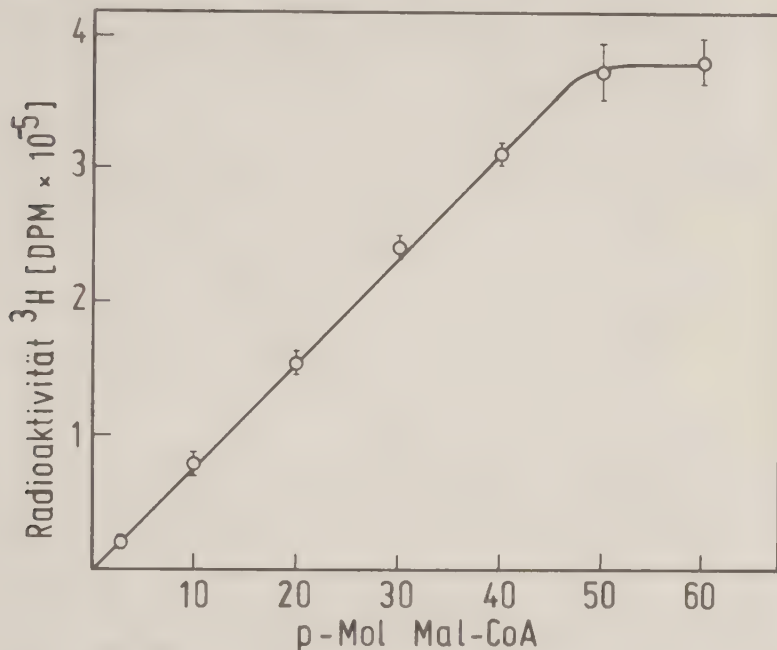


Abb. 3: Eichung des radiochemischen Tests zur Bestimmung der Malonyl-CoA-Konzentration. Die Radioaktivität entspricht dem Einbau von ^3H in Fettsäuren.

Wie aus der Eichkurve ersichtlich läßt die Empfindlichkeit der Methode noch eine Bestimmung von 5 pmol Malonyl-CoA pro Inkubation zu. Bei höheren Malonyl-CoA-Konzentrationen wurde das eingesetzte B-³H-NADPH begrenzend, sodaß die Eichkurve ein oberes Plateau erreichte. Im Bedarfsfall konnte das B-³H-NADPT hoher spezifischer Aktivität beliebig verdünnt werden; es war nur darauf zu achten, daß ein hochgereinigtes, mindestens 97 %iges NADPH zur Verdünnung eingesetzt wurde, da mit dem käuflichen 69-76 %igen NADPH Nichtlinearitäten der Eichkurven bei geringen Malonyl-CoA-Konzentrationen beobachtet wurden (Abb. 4):

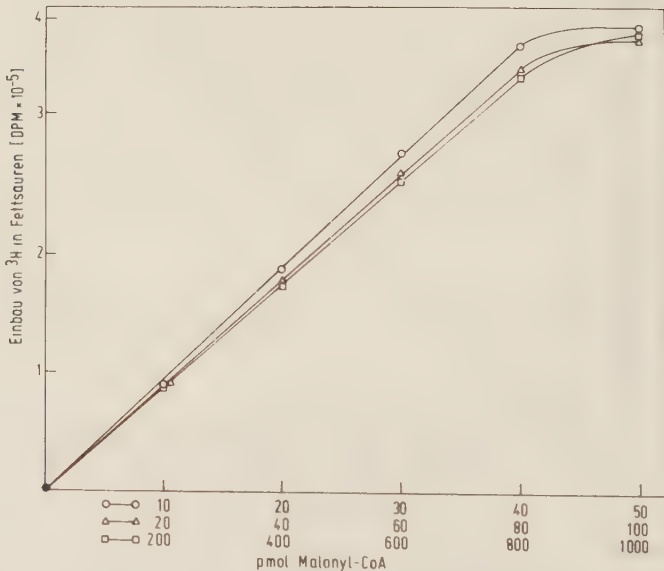
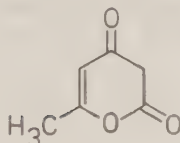


Abb. 4: Vergleich von Eichkurven mit verschiedenen spezifischen Aktivitäten an B-³H-NADPT. (Inkubationsbedingungen s. exp. Teil S. 72)

- unverdünnte B-³H-NADPH-Stammlösung.
- △—△ 1:1 mit nicht markiertem NADPH verdünnte Stammlösung.
- 1:10 mit nicht markiertem NADPH verdünnte Stammlösung.

2.4 Untersuchung zum unvollständigen Einbau des Tritium-wasserstoffs aus B-³H-NADPH in Fettsäuren.

Aus den Eichkurven (Abb. 3,4) kann entnommen werden, daß ca. 6600 - 7900 DPM Tritiumatome pro pmol Malonyl-CoA in Fettsäuren eingebaut werden. Das eingesetzte B-³H-NADPH hatte eine spezifische Radioaktivität von ca. 8800 DPM ³H / pmol. Das stöchiometrische Verhältnis von B-³H-NADPH zu Malonyl-CoA betrug demnach 1 : 0.70 - 0.90. Wie aber aus der Reaktionsgleichung 3 erwartet wird, sollten pro Mol Malonyl-CoA zwei Mol Tritiumatome aus NADPH in Fettsäuren inkorporiert werden können. Da auf Grund der Testbedingungen die Substratkonzentrationen von B-³H-NADPH mit 1.5×10^{-7} weit unter dem K_M von NADPH mit 6.7×10^{-5} (142) liegen, wurde zunächst vermutet, daß die von Willecke (157) beobachtete Triacetsäurelaktone-Bildung (TAL) zum Tragen kommt.



Triacetsäurelaktone

Diese Verbindung entsteht in Gegenwart von Synthetase aus ein Mol Acetyl-CoA und zwei Molen Malonyl-CoA bei Abwesenheit von NADPH. Wie bei einem anderen Multienzymkomplex der 6-Methylsalizylsäure-Synthetase aus *P. patulum* gefunden wurde (158), kommt es bei diesem ebenfalls NADPH, Malonyl-CoA und Acetyl-CoA verbrauchenden Enzym bei NADPH-Konzentrationen unter der K_M -Konzentration zur merklichen TAL-Bildung. Als Konsequenz für unsere Versuche würde dies bedeuten, daß ein Teil der vorgelegten Malonyl-CoA Menge abgefangen wird und nicht zur Fettsäuresynthese zur Verfügung steht.

Weiterhin überraschte, daß von den ca. 1,32 Mill. vorgelegten Tritium-NADPH nur maximal 350 000 - 400 000 DPM ^3H in Fettsäuren wiedergefunden werden konnten; dies entspricht einer Einbaurate von 26 - 30 %.

Überraschenderweise stellten wir fest, daß ein großer Teil der nicht umgesetzten Radioaktivität im Kondensat als tritiiertes Wasser nach Lyophilisation der Inkubationen wiedergefunden wurde. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob diese Tritiumwasserbildung durch Anwesenheit der Fettsäuresynthetase oder auf Grund unspezifischer Oxidationsreaktionen zustande kommt. Also wurden steigende Mengen Fettsäuresynthetase aus Hefe mit $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ ohne weitere Substrate 15 min lang inkubiert. Nach Gefriertrocknung der Enzyminkubation konnte im Kondensat Tritiumwasser nachgewiesen werden, dessen Menge proportional der Menge zugesetzter Fettsäuresynthetase was. An dieser Geschwindigkeit der Tritiumwasserbildung änderte sich nichts, wenn man jeweils nur Acetyl-CoA oder nur Malonyl-CoA den Inkubationen zusetzte (Abb. 5).

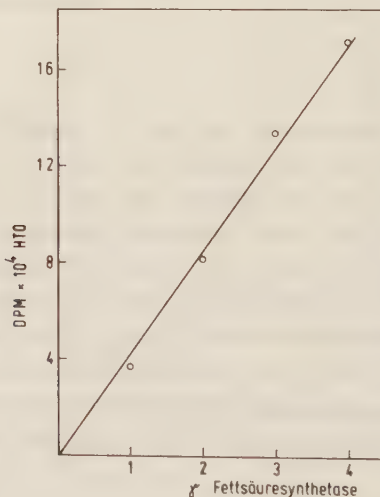


Abb. 5: Tritiumwasserbildung in Abhängigkeit von Fettsäuresynthetase aus Hefe.
Bedingungen: 100 μmol K-P₉₄-Puffer pH 6.5, 0.2 mg Serumalbumin, 300 pmol $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$, in 1 ml, $t = 25^\circ\text{C}$, Inkubationsdauer 15 min (s. exp. Teil S. 73)

Nachdem wir die durch FSS katalysierte Tritiumwasserbildung festgestellt hatten, mußte eine Ursache für diese unerwartete Reaktion gesucht werden:

Im Verlauf der Fettsäurebiosynthese nach Lynen (97) (s. Abb. 6) wird zwischen dem Acetyl- und dem Malonylrest am aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms unter Abspaltung von CO_2 ein 4'-phosphopantetheingebundener Acetoacetylrest gebildet. Dieser wird am aktiven Zentrum der β -Ketoacylreduktase durch NADPH zum β -Hydroxybutyrylrest reduziert, der am aktiven Zentrum der Dehydratase zum Crotonylrest modifiziert wird. Eine zweite Reduktion mit NADPH unter Beteiligung von FMN führt zur Bildung eines Butyrylrestes, der, wie im 1. Zyklus der Acetylrest, auf die periphere SH-Gruppe übertragen wird. Die Aufnahme eines zweiten Malonylrestes leitet einen weiteren Reaktionszyklus ein.

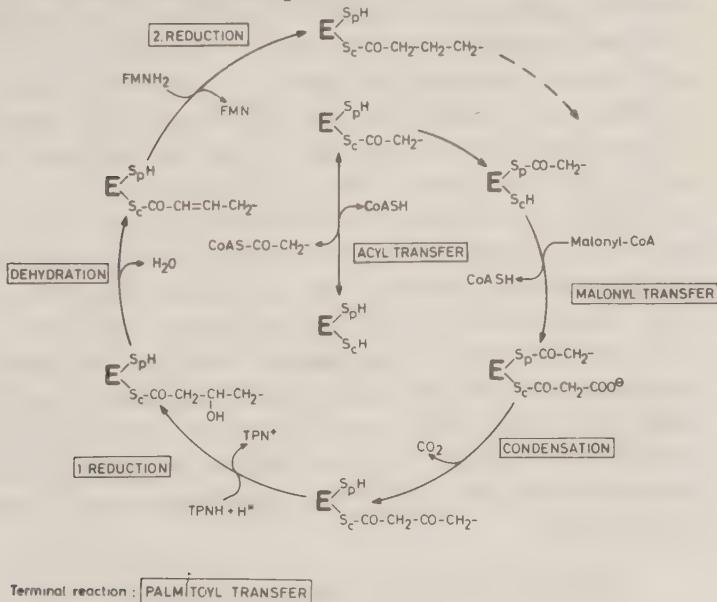


Abb. 6: Schema der durch FSS katalysierten Reaktionen (1)

Eine unserer Annahmen war, daß das intermediär gebildete FMNH_2 die am Stickstoff gebundenen Protonen mit denen des Wassers nach folgenden Gleichungssystemen austauscht (Gleichung 4 - 6). Da NADPH mit -0.31 V in der elektrochemischen Spannungsreihe negativer als FMNH_2 mit -0.19 V ist (159), wird die Beladung von FMN mit Wasserstoff durch NADPH vollständig sein.



Die Reaktion nach Gleichung 6 käme allerdings in dem Augenblick zum Stillstand, wenn alles FMN der FSS mit Wasserstoff beladen ist. Es ist aber bekannt, daß die bei der normalen Fettsäuresynthese mit Substratkonzentrationen zehnfach über die jeweiligen K_M kaum ins Gewicht fallende NADPH-Oxidation bei unseren geringen Testkonzentrationen eine Rolle spielt. Inkubiert man nämlich Fettsäuresynthetase mit NADPH alleine und verfolgt die Abnahme der Extinktion von NADPH am Photometer, so findet man Geschwindigkeiten von ca. $5 - 10$ pmol NADPH/min/ μg FSS (158). Wahrscheinlich wird also das von NADPH mit Wasserstoff beladenen FMN der FSS durch Luftsauerstoff zu Wasser oxidiert. Ein weiterer Hinweis für die Oxidation des NADPH durch FSS ist der Befund, daß diese Reaktion in entgasten Inkubationslösungen deutlich langsamer abläuft. Diese bei unseren geringen Substratkonzentrationen spürbare FMNH_2 Oxidation stellt erneut FMN zur Beladung mit Tritium aus $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ zur Verfügung, sodaß die erwähnte Tritiumwasserbildung durch Austausch gemäß Gleichung 5 weiter in Gang bleibt.

Um die Beteiligung des enzymgebundenen Flavins an der Tritiumwasserbildung weiter zu erhärten, wurden folgende Experimente durchgeführt:

Eine Inkubation von $B\text{-}^3\text{H}\text{-NADPH}$ mit 0.3 mM FMN mit und ohne Acetyl-CoA und Malonyl-CoA und ohne Enzym zeigte bis zu 20 min keine Oxidation des Coenzyms zu tritiiertem Wasser.

Es wurde weiterhin eine von FMN freie Fettsäuresynthetase (98,99,100) in Anwesenheit von Malonyl- und Acetyl-CoA mit $B\text{-}^3\text{H}\text{-NADPH}$ inkubiert, wobei sich zeigte, daß eine so behandelte FSS die Fähigkeit der Tritiumwasser-Bildung verloren hatte, da im Lyophilisat kein tritiiertes Wasser nachgewiesen werden konnte. Aus dieser Inkubation konnte in Abhängigkeit von der Zeit mit Petroläther ein geringer Anteil Radioaktivität extrahiert werden (Abb. 7). Die Identifizierung dieser Substanz im Petrolätherextrakt wurde nicht versucht.

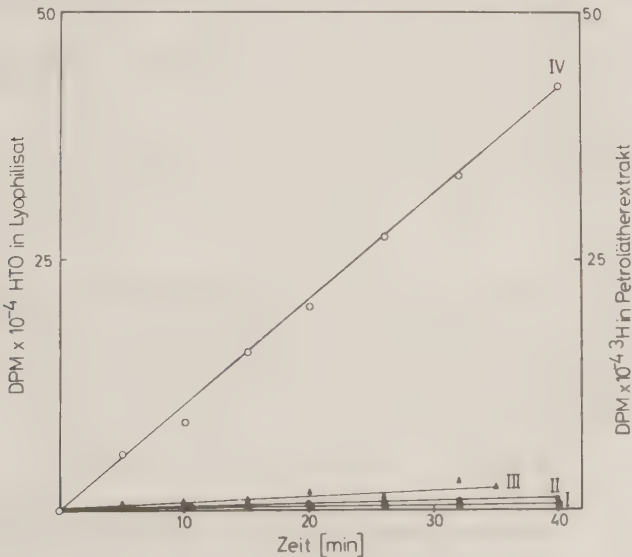


Abb. 7: Tritiumwasserbildung mit FMN freier FSS in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Legende s. S. 18

Legende zu Abb. 7:

Bedingungen: je 4,5 µg Apo-FSS, 150 pmol B-³H-NADPH, 19 pmol Malonyl-CoA, 10 pmol Acetyl-CoA, 15 µmol K-PO₄-Puffer pH 6,5; V = 0.15 ml, t = 25° C.

Kurve I : Kontrolle, ohne Protein, HTO im Lyophilisat

Kurve II : Kontrolle, ohne Protein, ³H im Petroläther

Kurve III : mit Apo-FSS, HTO im Lyophilisat

Kurve IV : mit Apo-FSS, ³H im Petrolätherextrakt.

(Weitere Einzelheiten exp. Teil S. 74).

Die nach (98,99,100) hergestellte Apo-FSS wurde durch Zusatz von FMN reaktiviert (101,102). Anschließend wurde diese reaktivierte FSS wiederum mit einer Mischung aus B-³H-NADPH, Malonyl-CoA und Acetyl-CoA versetzt und die Bildung von tritiiertem Wasser und tritiierten Fettsäuren verfolgt. Diese reaktivierte FSS hatte die Fähigkeit zur Tritiumwasser- und zur Fettsäuresynthese wiedererlangt (Abb. 9a).

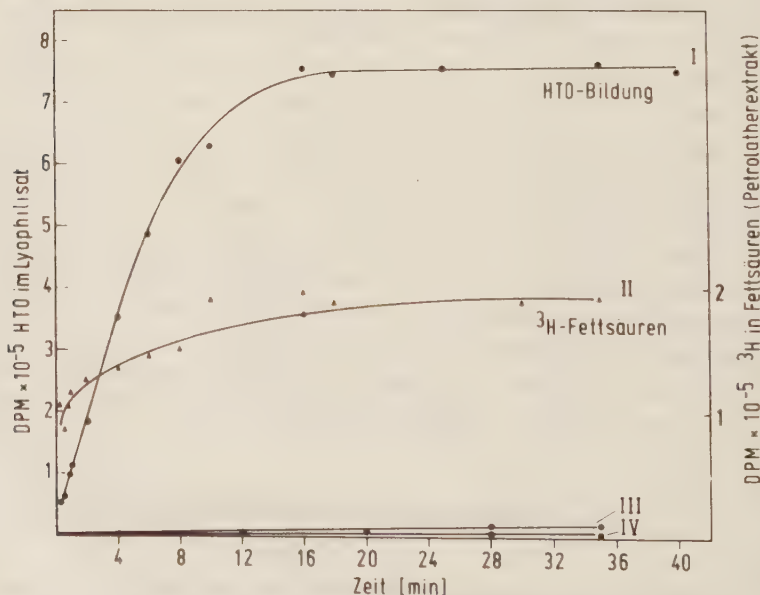


Abb. 9a: Bildung von Tritium-Wasser und Fettsäuren bei der Inkubation von reaktivierter FSS mit B-³H-NADPH, Acetyl-CoA und Malonyl-CoA. Legende s. S. 19.

Legende zu Abb. 9a:

Bedingungen: 4 μ g reaktivierte FSS; 38,2 pmol Malonyl-CoA, 10 pmol Acetyl-CoA, 150 pmol B-³H-NADPH, 15 μ mol K-PO₄⁻, Puffer pH 6,5; V = 0,166 ml, T = 25° C.
(Weitere exp. Einzelheiten S. 74).

Kurve I : Tritiumwasserbildung im Lyophilisat

Kurve II : ³H-Fettsäuren im Petrolätherextrakt

Kurve III : Tritiumwasserbildung ohne Protein.

Kurve IV : ³H-Fettsäuren im Petrolätherextrakt nach Inkubation ohne Protein.

Faßt man die bisher erhaltenen Ergebnisse zusammen, so zeigt sich, daß das an FSS gebundene FMN für die Tritiumwasserbildung verantwortlich ist. Auch für die inkomplette Malonyl-CoA : NADPH Stöchiometrie kann das enzymgebundene Flavin eine Erklärung liefern: Wie schon erwähnt ist die Reduktion von FMN zum Leukoflavin durch NADPH auf Grund des negativeren elektrochemischen Potentials von NADPH sehr begünstigt. Wenn aber der Tritiumwasseraustausch sehr schnell abläuft, so kommt die Inkorporation von Tritium in Fettsäuren während der zweiten Reduktion gar nicht mehr zum Zuge und deshalb werden statt der erwarteten zwei Mole NADPH nur knapp ein Mol dieses Coenzym in Fettsäuren wiedergefunden. In wieweit die zuerst diskutierte TAL-Bildung zusätzlich zur Flavin abhängigen HTO-Synthese eine Verminderung des Tritiumeinbaus in Fettsäuren bewirkt, war nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Eine weitere Problematik, die sich schon in Abb. 9a widerspiegelt, soll nicht unerwähnt bleiben: Bei Abb. 9c zeigt sich, daß von den vorgelegten 1.32 Mill. DPM B-³H-NADPH ca. 750 000 DPM ³H im Wasser und ca. 200 000 DPM in ³H-Fettsäuren erscheinen. Es bleibt also ein Rest von ca. 28 % der eingesetzten Radioaktivität im Rückstand der Lyophilisation.

Außerdem wurde festgestellt, daß die Tritiumwasserbildung gegenüber der ^3H -Fettsäurebildung etwas verzögert war. Diese Beobachtungen wurden durch weitere Untersuchungen ergänzt: Es wurden vier parallele Ansätze mit einer Mischung aus 10 pmol Acetyl-CoA, 100 pmol $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ und 1 μg Fettsäuresynthetase mit 0,20,40, bzw. 80 pmol Malonyl-CoA versetzt und die Kinetik der HTO und Fettsäurebildung verfolgt (Abb. 9b,9c). Dabei stellten wir fest, daß die Tritiumwasserbildung beim Ansatz ohne Malonyl-CoA alles vorgelegte $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ im Kondensat der Lyophilisation als Tritiumwasser erschien und keine Fettsäuresynthese auf Grund mangelnder C_2 -Bausteine aus Malonyl-CoA ablief. Je mehr Malonyl-CoA vorgelegt war, um so langsamer lief die Bildung tritiierten Wassers ab und um so mehr kam die Fettsäuresynthese zum Tragen. Diese verlangsamte HTO-Bildung unter kompletten Fettsäuresynthese-Bedingungen überraschte, da ja im Hinblick auf die Schlüsselrolle des Flavins bei dieser Reaktion angenommen worden war, daß die Geschwindigkeit der HTO-Bildung wesentlich von der Oxidation des FMNH_2 zu FMN abhängt. Bei kompletten Synthesebedingungen sollte aber als Folge im Verlauf der Reduktion der Enoyl-ACP-Verbindungen vermehrt FMN zurückgebildet werden. Da aber dennoch eine verlangsamte HTO-Bildung eintritt, kann man eine durch Syntheseprodukte wie die Enoyl-ACP-Verbindungen verlangsamte Beladung des Flavins annehmen. Zum anderen kann es durch Zusammenkommen des β -Ketoacylreduktase - (entspricht der ersten Reduktion der Abb. 6) und des Enoylreduktaseschritts (entspricht der zweiten Reduktion in Abb. 6) zu einem erhöhten NADPH-Verbrauch und damit zusammenhängend zu einer langsameren Beladung des Flavins mit Wasserstoff kommen, sodaß hiermit ebenfalls die HTO-Bildung beeinträchtigt wird.

Daß im Fall der Inkubation mit FMN reaktivierter FSS die HTO-Synthese gegenüber der Fettsäuresynthese verlangsamt war, läßt auf eine partielle Schädigung der zweiten Reduktion durch die FMN-Abspaltung und die Reaktivierung schließen.

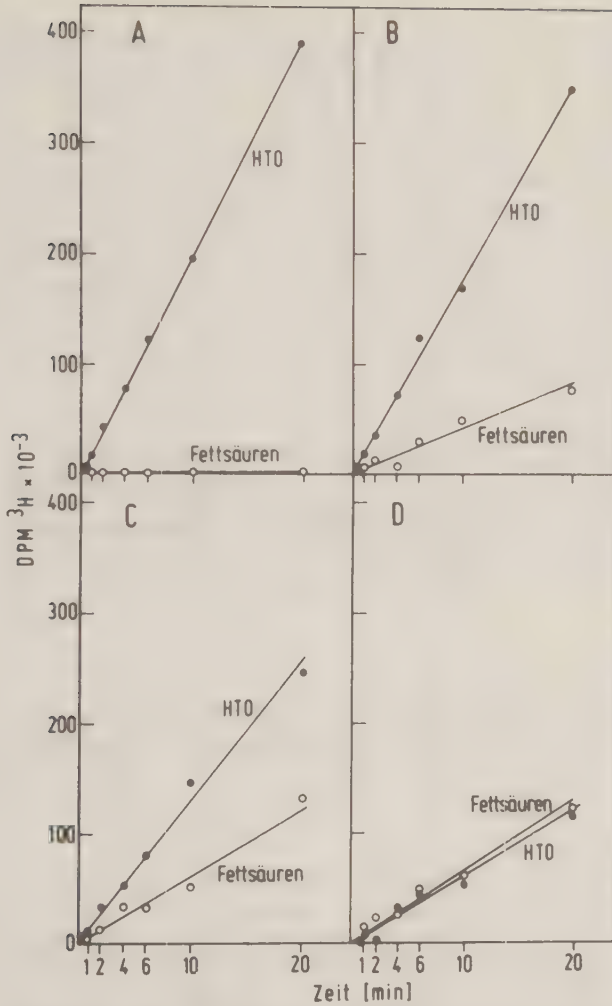


Abb. 9b: Kinetik der Tritiumwasser und Fettsäurenbildung bei der Inkubation von FSS mit B- ^3H -NADPH, Acetyl-CoA und Malonyl-CoA.

Bedingungen: 1 μg FSS (spez. Aktivität 2600 mE/mg) 150 pmol B- ^3H -NADPH, 10 pmol Acetyl-CoA, 15 μmol K- PO_4 -Puffer pH 6,5, V = 0.166 ml, T = 25°C. (Exp. Einzelheiten s. S. 75)

Offene Kreise: ^3H -Fettsäuren im Petrolätherextrakt. Geschlossene Kreise: HTO-Bildung im Lyophilisat.

Graph A : ohne Malonyl-CoA

Graph B : 20 pmol Malonyl-CoA

Graph C : 40 pmol Malonyl-CoA

Graph D : 80 pmol Malonyl-CoA

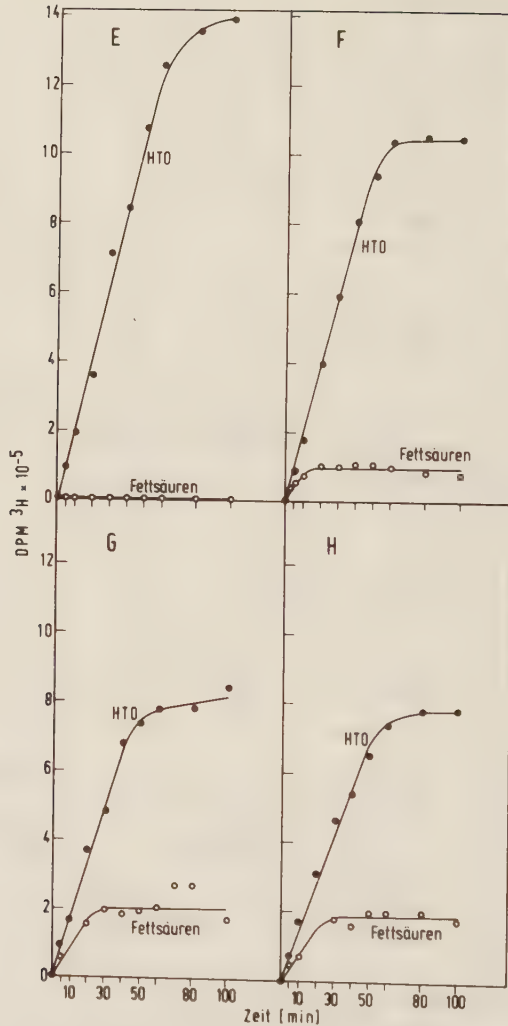


Abb. 9 c: Kinetik der Tritiumwasser und Fettsäurenbildung bei der Inkubation von FSS mit $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$, Acetyl-CoA und Malonyl-CoA.

Bedingungen: 1 μg FSS (spez. Aktivität 2600 mE/mg), 150 pmol $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$, 10 pmol Acetyl-CoA, 15 μmol K-PO_4 -Puffer pH 6.5, $V = 0.166$, $T = 25^\circ\text{C}$.
(Exp. Einzelheiten s. S. 75)

Offene Kreise: ^3H -Fettsäuren im Petrolätherextrakt.

Geschlossenen Kreise: HTO-Bildung im Lyophilisat.

Graph E : ohne Malonyl-CoA

Graph F : 20 pmol Malonyl-CoA

Graph G : 40 pmol Malonyl-CoA

Graph H : 80 pmol Malonyl-CoA

In allen Fällen (Abb. 9a, 9c) wurde beobachtet, daß die Bilanz der radioaktiven Produkte Tritiumwasser und ^3H -Fettsäuren bei der kompletten Fettsäuresynthese bis zu 30 % unter derjenigen des Versuchs von FSS mit $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ alleine lag. Bei letzterem Versuch erschien alles vorgelegte $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ im Kondensat der Lyophilisation als tritiiertes Wasser. Es ist denkbar, daß im Rückstand der Lyophilisation der kompletten Synthese tritiierte kurzkettige Zwischenprodukte mit Petroläther nicht extrahiert werden und daher in der Bilanz nicht berücksichtigt werden konnten.

Für die Anwendung des radiochemischen Tests zur Malonyl-CoA-Bestimmung im Lebergewebe und in der Hefe sind diese Details jedoch ohne Belang, da dieser Test nicht auf Messung des Verbrauchs an $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$, sondern auf Messung der Bildung tritiiertter Fettsäuren beruht.

2.5 Untersuchung der Fettsäurenkettenlänge, die unter den Bedingungen des radiochemischen Malonyl-CoA-Testes entstehen.

Bei der Messung von Gewebeproben mit dem in Kap. 2.1 beschriebenen radiochemischen Verfahren war nicht nur Malonyl-CoA, sondern auch Acetyl-CoA vorhanden, das evtl. den Vergleich von Extrakten mit verschiedenem Acetyl-CoA-Gehalt verfälschen könnte, da der Acetyl-CoA-Spiegel normal gefütterter Tiere von 27 nmol/g feuchte Leber auf 76 nmol bei Hungertieren steigt (103). In der Absicht, diese Verschiedenheiten im Gehalt der Extrakte zu kompensieren, wurden zunächst - verglichen zum Malonyl-CoA-Gehalt - sehr große Mengen Acetyl-CoA in den Inkubationen eingesetzt. Ein 10-200-facher Überschuß von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA zeigte nach gaschromatographischer Produktanalyse folgendes Bild (Abb. 10):

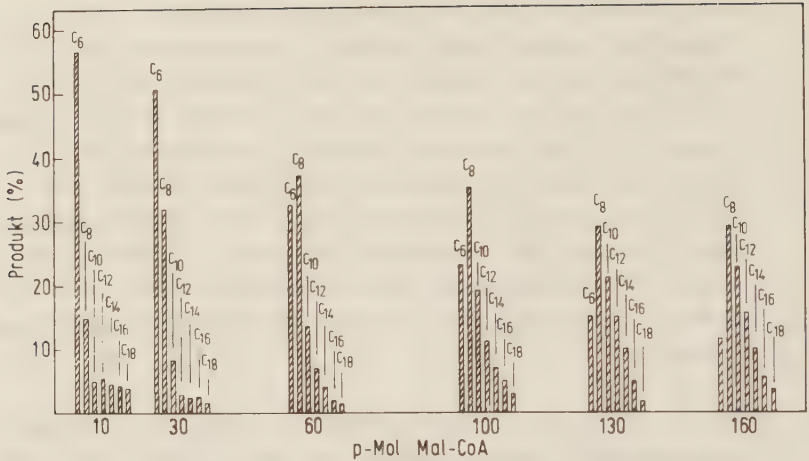


Abb. 10: Produktverteilung der mit Acetyl-CoA-Überschuß gebildeten Fettsäuren. Je 2,0 nmol Acetyl-CoA und 320 pmol B-³H-NADPH pro Inkubation. (Exp. Einzelheiten s. S. 77).

Unter diesen Synthesebedingungen wurden hauptsächlich kurzkettige Fettsäuren gebildet. Dieser Befund steht im Einklang mit den Versuchen von Sumper und Oesterheld (104,105).

Die Erwartung, daß unter gleichen Substrat- und Inkubationsbedingungen bei Acetyl-CoA-Überschuß die Produktverteilung des Eichversuchs mit der unter Verwendung eines Rattenleberextraktes erhaltenen identisch sein sollte, wurde nicht erfüllt (Abb. 11). Vielmehr trat bei den Gewebeproben eine Verlagerung des Prozentanteils zu langkettigen Fettsäuren auf, mit einem signifikanten Minimum des Laurinsäureanteils.

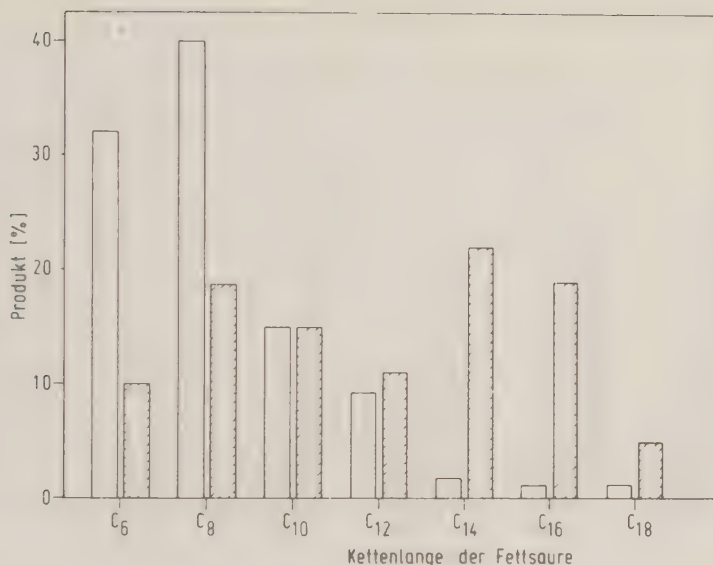


Abb. 11. Vergleich der relativen Häufigkeiten gebildeter Fettsäuren, die durch Inkubation des Malonyl-CoA enthaltenden Rattenleberextraktes, bzw. im parallelen Eichversuch durch Inkubation derselben Menge synthetisches Malonyl-CoA, erhalten wurden.

(Jeweils Acetyl-CoA-Überschuß, konstante Mengen Malonyl-CoA, exp. Einzelheiten s. S. 77)

Weißer Balken: Eichversuch

Schwarzer Balken: Rattenleberhomogenat

Wegen diesem nicht eingehender untersuchten Befund und ausgehend von der Tatsache, daß bei der Petrolätherextraktion ein großer Teil der kurzkettigen Carbonsäuren, insbesondere Capronsäure, nur unvollständig in den Petroläther überging (Abb. 12), war es sinnvoll, bei der Bestimmung von Malonyl-CoA nur geringe, definierte Mengen Acetyl-CoA einzusetzen.

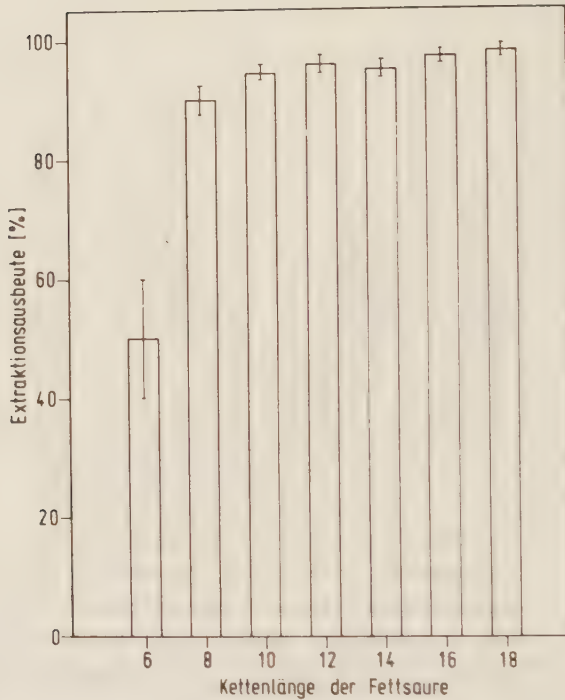


Abb. 12: Abhängigkeit der Extraktionsausbeuten mit Petroläther von der Kettenlänge der Fettsäuren.

(Exp. Einzelheiten s. S. 72)

Das Ergebnis eines Versuchs, bei dem eine Inkubation von Fettsäuresynthetase, 130 pmol B-³H-NADPH, in Gegenwart von 10 pmol Acetyl-CoA mit steigenden Mengen Malonyl-CoA (2-40 pmol) versetzt wurde, zeigt nach gaschromatographischer Aufarbeitung, daß unter diesen Bedingungen fast nur langkettige Fettsäuren gebildet werden (Abb. 13):

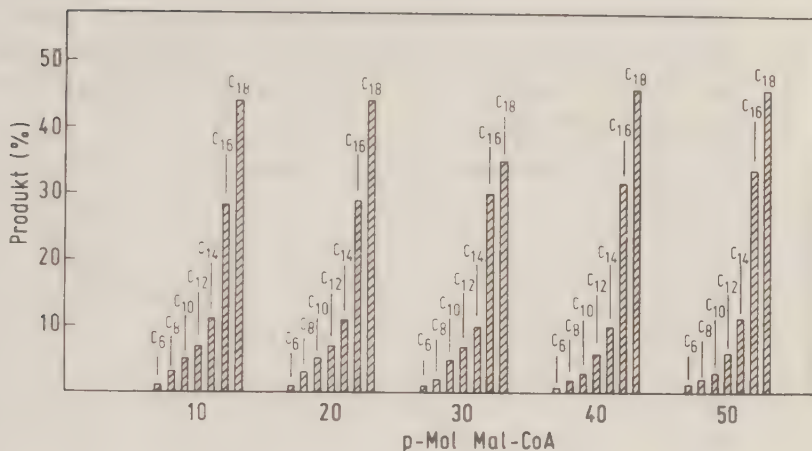


Abb. 13: Produktverteilung der mit Acetyl-CoA-Überschuß gebildeten Fettsäuren.

Bedingungen: je 10 pmol AcCoA, 150 pmol B-³H-NADPH, 4 µg FSS, 100 mmol K-PO₄-Puffer pH 6,5; V = 1 ml, T = 25° C, Inkubationsdauer: 30 min. (Weitere exp. Einzelheiten s. S. 71).

Um vergleichbare Resultate erhalten zu können, war es notwendig, das in den Gewebeproben anwesende Acetyl-CoA zu entfernen und jeweils konstante Mengen dieses Substrates zur Malonyl-CoA-Messung einzusetzen.

Diese Aufgabe wurde gelöst, indem der nach Perchlorsäurefällung neutralisierte Gewebeeextrakt vor der Malonyl-CoA-Messung mit Citratsynthase und einem 100-fachen Oxalacetat-Überschuß von Acetyl-CoA befreit wurde.

Unter Bildung von Citrat, das die sich anschließende Malonyl-CoA-Messung nicht beeinflusste, war die Reaktion innerhalb von 5 min beendet. Durch kurzzeitiges Erhitzen des so behandelten Gewebeaufschlusses wurde die zugesetzte Citratsynthase inaktiviert. Im Verlauf der gesamten Prozedur wurden ca. 3 % des vorhandenen Malonyl-CoA zerstört (Abb. 14).

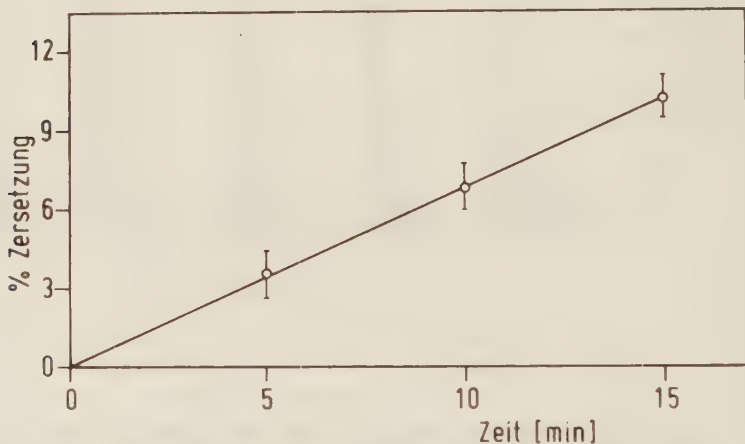


Abb. 14: Verbrauch von Malonyl-CoA bei der Acetyl-CoA-Entfernung durch Citratsynthase und durch Oxalacetat im Rattenleberextrakt in Abhängigkeit von der Zeit.

Bedingungen: Zu 12 ml enteiweißtem und neutralisiertem Homogenat aus 4 g Rattenleber wurden 2.5, 5.0 bzw. 7.5 μM synthetisches Malonyl-CoA und anschließend jeder Inkubation 630 nmol Oxalessäure, 2.5 U Citratsynthase zugesetzt. Nach 5, 10 bzw. 15 min wurde die Reaktion durch 3 min Erhitzen auf 85°C gestoppt und der Malonyl-CoA-Spiegel gemessen.

(Weitere Einzelheiten s. S. 79)

Der so behandelte Gewebeextrakt wurde mit derselben wie bei der Eichung verwendeten geringen Menge Acetyl-CoA zur Malonyl-CoA-Messung eingesetzt, wobei die gaschromatographische Verteilung entstandener Fettsäuren recht genau mit der im Eichversuch gefundenen übereinstimmte (Abb. 15).

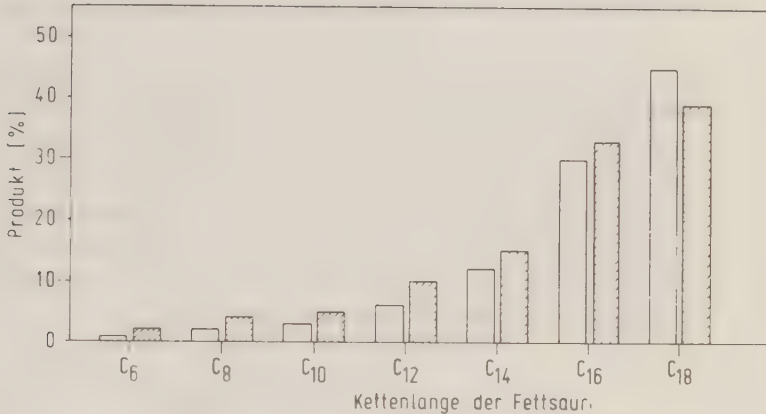


Abb. 15: Vergleich der relativen Häufigkeiten gebildeter Fettsäuren, die durch Inkubation des Malonyl-CoA enthaltenden Rattenleberextraktes, bzw. im parallelen Eichversuch durch Inkubation derselben Menge synthetisches Malonyl-CoA, erhalten werden.

Weißer Balken: Eichversuch

Schwarzer Balken: Leberhomogenat

2.6 Gehaltsbestimmung von Malonyl-CoA in der Rattenleber und Bäckerhefe

Der Zellaufschluß von Rattenleber- und Hefezellen erfolgte durch Frierstopfixierung, Pulverisierung unter flüssigem Stickstoff und anschließende Extraktion mit verdünnter Perchlorsäure (106). Die Ratten wurden nach Betäubung durch Schlag auf den Kopf mit der Doppelmesser-

methode von Faupel, Seitz und Tarnowski (107) getötet. Die von Siedel (94) berichteten Schwierigkeiten wurden behoben, indem auf das Doppelmesser mit einem ca. 5 kg schweren Gewicht geschlagen wurde. So war es möglich, daß vom Augenblick der Betäubung bis zur Frierstopfixierung der Leber nicht mehr als 20 sec verstrichen.

Die optimale Perchlorsäurekonzentration zur Fällung der Proteine im Rattenleberhomogenat lag bei 6 % und im Hefehomogenat bei 9 %, wobei die zweimalige Extraktion zur vollständigen Entfernung des Malonyl-CoA aus den Zelltrümmern ausreichte. Aus Abb. 16 kann man auch die Wiederfindungsrate des unmittelbar vor der ersten Perchlorsäurefällung zugesetzten synthetischen Malonyl-CoA entnehmen; sie betrug maximal 93 ± 2 %.

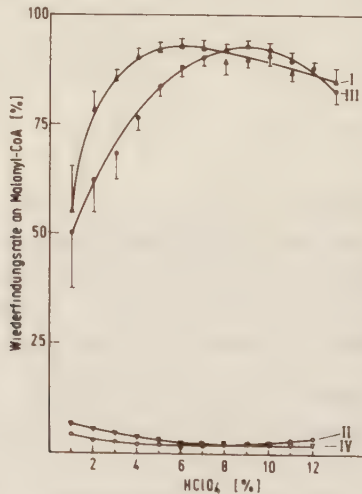


Abb. 16: Extraktionsausbeute von Malonyl-CoA aus Rattenleber- und Bäckerhefehomogenaten mit verschiedenen Perchlorsäurekonzentrationen
Kurve I: % Wiederfindung, Rattenleberextrakt 1. u. 2. HClO₄-Fällung.
Kurve II: wie I, 3. und 4. Fällung.
Kurve III: % Wiederfindung, Bäckerhefeextrakt 1. und 2. HClO₄-Fällung
Kurve IV: wie III, 3. und 4. Fällung.
(Exp. Einzelheiten s. s. 80).

Eine weitere Untersuchung galt der Stabilität von Malonyl-CoA während der Eiweißfällung mit 6 % Perchlorsäure. Nach 30 min wurden etwa 5 % des zugesetzten Malonyl-CoA zerstört (Abb. 17).

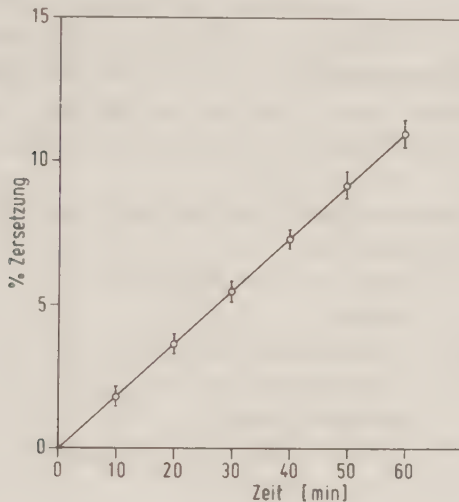


Abb. 17 Malonyl-CoA-Zersetzung durch 6 %ige HClO_4 in Abhängigkeit von der Zeit.

Zum Zeitpunkt Null war $[\text{Malonyl-CoA}] = 5 \mu\text{M}$, $T=0^\circ\text{C}$
(Exp. Einzelheiten s. S. 81)

Der neutralisierte Gewebeextrakt wurde auf den Gehalt an NADPH untersucht, da dieses Coenzym wegen der Isotopenverdünnung des $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ den radiochemischen Malonyl-CoA Test stören würde. Die photometrische Bestimmung der Umsetzung von NADPH mit oxidiertem Glutathion, katalysiert von Glutathion-Reduktase, konnte selbst Spuren von NADPH im Gewebeaufschluß nach der Perchlorsäurefällung nicht nachweisen.

Um die Absolutkonzentrationen von Malonyl-CoA in Rattenleber- und Hefeextrakten zu erhalten, wurde rechnerisch eine Korrektur vorgenommen, die mit der in Abb. 17 erhaltenen Geradensteigung und der Neutralisationsdauer des Perchlorsäureextraktes den jeweiligen Zersetzungsgrad berücksichtigte (s. Berechnungsformel S. 33).

2.7 Der Malonyl-CoA-Spiegel der Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen

Nachdem sich das radiochemische Testverfahren den bekannten optischen Testmethoden zur Malonyl-CoA-Bestimmung mit seiner tausendfach größeren Empfindlichkeit als weit überlegen erwiesen hatte, konnte der Einfluß von Stoffwechselzuständen mit veränderter Fettsäuresynthese auf den Malonyl-CoA-Gehalt der Rattenleber untersucht werden.

Für die Tierexperimente wurden dazu folgende Lebensbedingungen ausgesucht:

1. Tag- und Nachtrhythmus
2. Hunger
3. Alloxandiabetes
4. Kohlenhydratfütterung
5. Fettfütterung
6. Alkohol und Fettfütterung
7. Proteinfütterung

2.7.1 Tag- und Nachtrhythmus

Hinweise auf den circadianen Rhythmus der Lipogenese von Ratten fanden Scott et al. und Kimura et al. (108,109). Als Ausdruck der Dunkelaktivität der Ratten zeigte sich, daß die Lipogenese nachts gesteigert ist. Es erschien sinnvoll, zuerst zu untersuchen, ob sich die tageszeitliche Schwankung der Lipogenese auf die Malonyl-CoA-Konzentration der Leber auswirkt.

Wie Abb. 18 zeigt, sinkt der Malonyl-CoA-Spiegel von 350-390 Gramm schweren, ausgewachsenen Ratten auf ein Minimum von 3,4 nmol/g feuchte Leber während der Beleuchtungsphase ab, und steigt im Dunkel auf maximal 5 nmol/g Leber an.

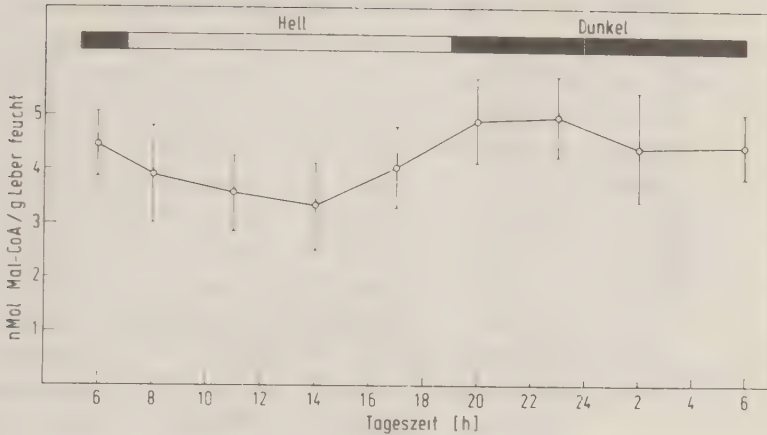


Abb. 18: Abhängigkeit des Malonyl-CoA-Gehaltes der Rattenleber von der Tageszeit. Bei jedem Meßpunkt wurde in vertikalen Strichen die Standardabweichung angegeben. Es wurden jeweils sechs Ratten untersucht.

2.7.2 Hunger

Im Hungerzustand ist es für den Körper notwendig, Energie aus den leicht zugänglichen Fettreserven zu mobilisieren, um die Glucose für den Bedarf des zentralen Nervensystems bereithalten zu können (100), gleichzeitig ist die Synthese langkettiger Fettsäuren reduziert (79). Der verstärkte Fettabbau, wie die gedrosselte Lipogenese beeinflussen den Malonyl-CoA-Spiegel der Leber (Abb. 19).

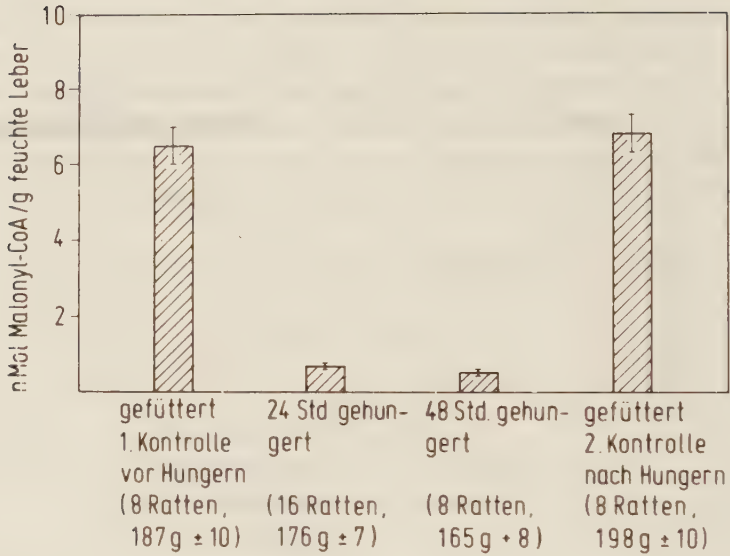


Abb. 19: Der Malonyl-CoA-Gehalt von Lebern gehungerter und normal gefütterter Ratten.

Schon nach 24 h Hunger sinkt der Malonyl-CoA-Spiegel auf unter 10 % des Normalwertes ab und beträgt nach 48 h ca. 520 pmol/g feuchte Leber. Diese Werte wurden von 180-220 g schweren Ratten erhalten. In Übereinstimmung mit Lockwood (111) zeigte sich, daß bei ca. 40-50 Tage alten Ratten die Lipogenese gegenüber ausgewachsenen Tieren (350-400 g) gesteigert ist. Die Kontrollwerte der normal gefütterten Ratten lagen daher in diesem Fall bei 6-7 nmol Malonyl-CoA pro Gramm feuchte Leber.

7.3 Alloxandiabetes

Diabetes mellitus ist durch erhöhte Glucosespiegel im Blut und Urin gekennzeichnet. Durch den Verlust der Glucose werden die Kohlenhydratspeicher verbraucht, sodaß schließlich auch vermehrte Fette und Proteine abgebaut werden. Die Mobilisierung der Fettspeicher führt zu hohen Acetyl-CoA-Konzentrationen, die aber aus Mangel an Oxalacetat nicht im Citronensäurecyclus verwendet werden können, sondern in Ketonkörpern bis zu 5 mM im Blut umgewandelt werden (112). Zur experimentellen Erzeugung des diabetischen Zustandes in Ratten wird bevorzugt Alloxan verwendet (110), wobei die Fettsäuresynthese drastisch erniedrigt wird (113). Anschließende Insulingaben lassen den Blut-Glucosespiegel diabetischer Ratten auf Normalwerte sinken, während die Fettsäuresynthese das Normalniveau übersteigt (114,115,116).

Die Ratten wurden nach der Alloxangabe sieben Tage lang mit Depotinsulin substituiert, um sie in einen schein-gesunden Zustand zu überführen. 24 h vor der Schlachtung wurde dann die Insulinsubstitution abgebrochen, sodaß die Tiere einen akuten Diabetes entwickelten, der sich in starker Gewichtsabnahme und großem Flüssigkeitsverlust äußerte.

Der unter diesen Bedingungen gemessene Malonyl-CoA-Spiegel erniedrigte sich auf 1,5 nmol/g Leber Feuchtgewicht, während er bei den alloxandiabetischen, insulin-substituierten Ratten auf 11 nmol anstieg (Abb.20; Normalwert: 6 nmol Malonyl-CoA für 300-350 g schwere Ratten).

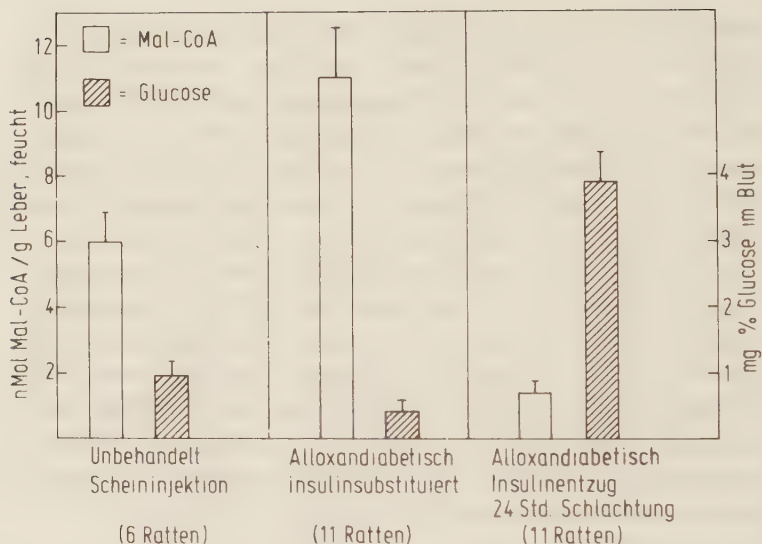


Abb. 20: Vergleich des Malonyl-CoA-Gehaltes der Lebern alloxandiabetischer und scheinbehandelter Ratten.

2.7.4 Kohlenhydratfütterung

Werden zwei Tage lang gehungerte Ratten mit einer fett-freien kohlenhydratreichen Diät gefüttert, so ist die Lipogenese innerhalb von sechs Stunden nach Wiederfütterung verstärkt (117,118,119). Die gesteigerte Fettsäuresynthese wurde von einem bis auf 13 nmol/g Leber feucht erhöhten Malonyl-CoA-Spiegel begleitet (Abb. 21). Im Vergleich zu Tieren, die mit Haltungsfutter gefüttert waren, erreichte der Malonyl-CoA-Spiegel zur selben Zeit nur 9,5 nmol. Der überproportionale Anstieg der Malonyl-CoA-Konzentration am Beginn der Wiederfütterung findet seine Parallele bei den von Muto et al. (120) gemessenen Enzymaktivitäten der Fettsäuresynthetase, des citrat-spaltenden Enzyms, des "malic enzyme" und der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase.

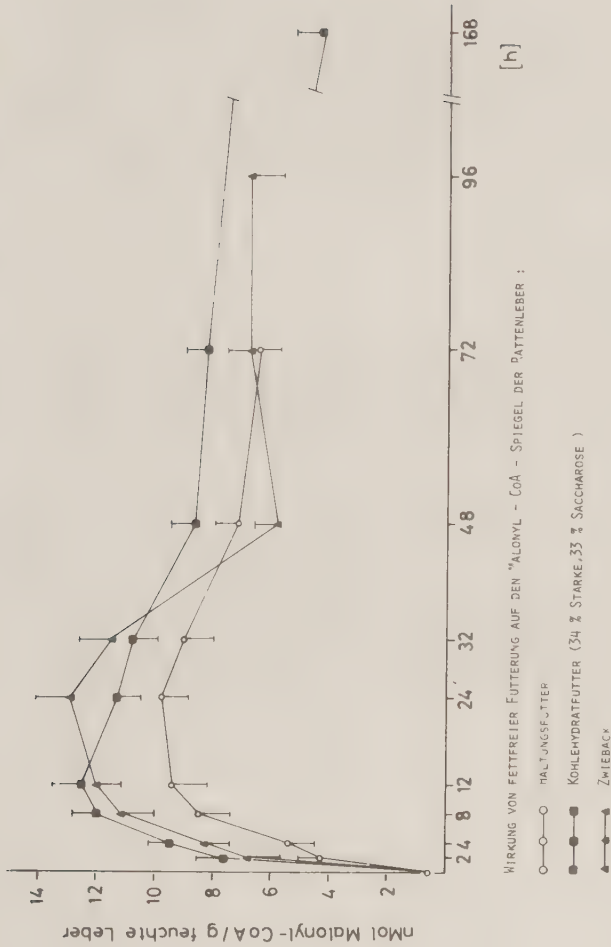


Abb. 21:

Bedingungen: Die Ratten wurden vor dem Versuch 48 h bis zu einem Gewicht von 150-200 g gehungert. Je acht Tiere stellen einen Meßpunkt dar.

2.7.5 Fettfütterung

Auch die Fütterung verschiedener Fettdiäten hatte bei 48 h gehungerten Ratten einen eindeutig senkenden Effekt auf die Malonyl-CoA-Konzentration der Leber. Als die Ratten mit Speck oder einer Diät aus 70 % Palmitinsäure und 23 % Casein wiedergefüttert wurden, stieg der Malonyl-CoA-Spiegel nicht über 1.5 nmol/g feuchte Leber (Abb. 23).

2.7.6 Alkohol und Fettfütterung

In einem weiteren "in vivo"-Experiment wurde überprüft, wie sich bei gleichzeitiger Gabe von Fett und Alkohol der Malonyl-CoA-Spiegel im Vergleich zu den nur mit Alkohol und Haltungsfutter behandelten Ratten verhält. Wenn durch hohe Alkoholdosen die cytosolische Acetyl-CoA-Konzentration erhöht ist, wie Siess et al. (123) an isolierten Leberzellen gehungerter Ratten zeigen konnten, und durch die gleichzeitige Anwesenheit von Fetten die Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität gehemmt ist, sollte trotz des genügenden Acetyl-CoA-Angebotes der Malonyl-CoA-Spiegel auf unverändert niedrigem Niveau bleiben.

Zunächst mußten Ratten an die Beimischung von Alkohol im Trinkwasser gewöhnt werden. Dies gelang durch eine Änderung der von Falk et al. (124) entwickelten Methode, die sich den gesteigerten Trinkwasserkonsum leicht gehungelter Tiere zunutze macht. Die etwa 300 g schweren Tiere wurden gehungert, bis sie ca. 20 % ihres Körpergewichts verloren hatten. Anschließend wurde ihnen 1 % Alkohol ad lib. mit einer definierten Menge Haltungsfutter (10 - 12 g) jeweils morgens und abends angeboten. Im Laufe von einigen Tagen wurde die Alkoholkonzentration schrittweise auf 5 % erhöht, wobei die Trinkmenge und das Gewicht der Ratten täglich bestimmt wurden. Nach 17 - 24 Tagen hatten sich die Tiere an die Futterbedingungen gewöhnt und auch das vor der Alkoholgabe festgestellte Gewicht wieder erreicht oder leicht überschritten. Zum jeweiligen Schlachtzeitpunkt wurde ein Blutalkoholspiegel von 2 - 3 Promille gemessen.

Nach 48 h Hunger erhielt ein Teil dieser Tiere Speck, dem anderen Teil wurde Normalfutter angeboten. Bei den mit Speck gefütterten Ratten stieg der Malonyl-CoA-Spiegel im Verlauf von 96 h auf knapp 2 nmol/g feuchte Leber, während er bei den normalgefütterten Ratten 9.5 nmol (Abb. 22), vergleichbar den in Kap. 2.7.5 beschriebenen Versuchen, erreichte. Die Messung der cytosolischen Acetyl-CoA-Konzentration unter diesen Bedingungen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

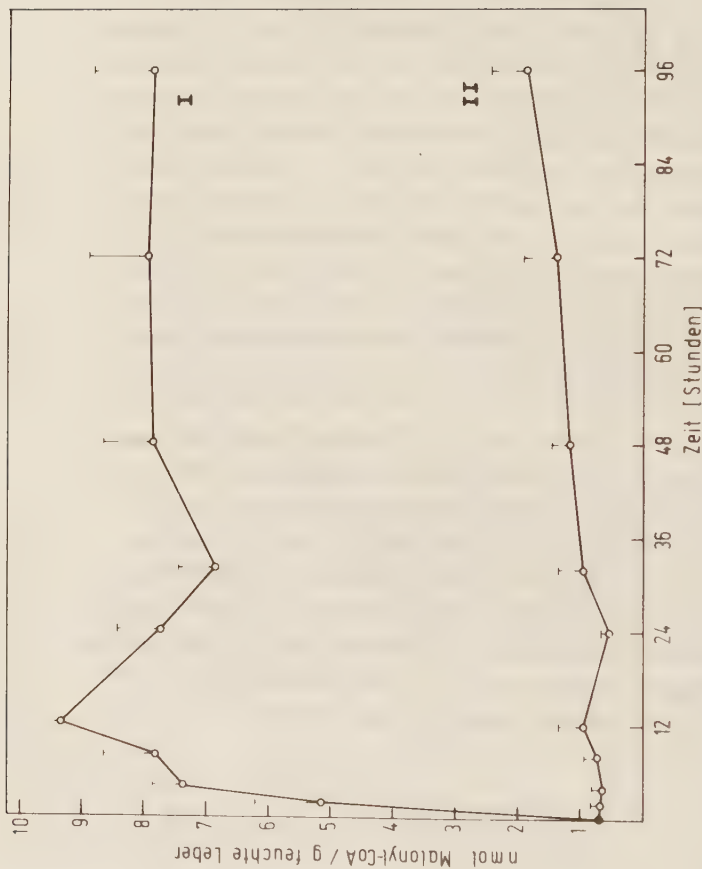


Abb. 22: Wirkung von Fett und Alkohol auf den Malonyl-CoA-Spiegel der Rattenleber. Bedingungen: Die Ratten wurden vor dem Versuch an Alkohol im Trinkwasser gewöhnt und wurden 48 h gehungert bis zu einem Gewicht von 150-200 g. Zum jeweiligen Schlachtzeitpunkt hatten je acht Ratten einen Blutalkoholspiegel von 2 - 3 ‰.

Kurve I: Fütterung mit Haltungsfutter. Kurve II: Fütterung mit Speck.

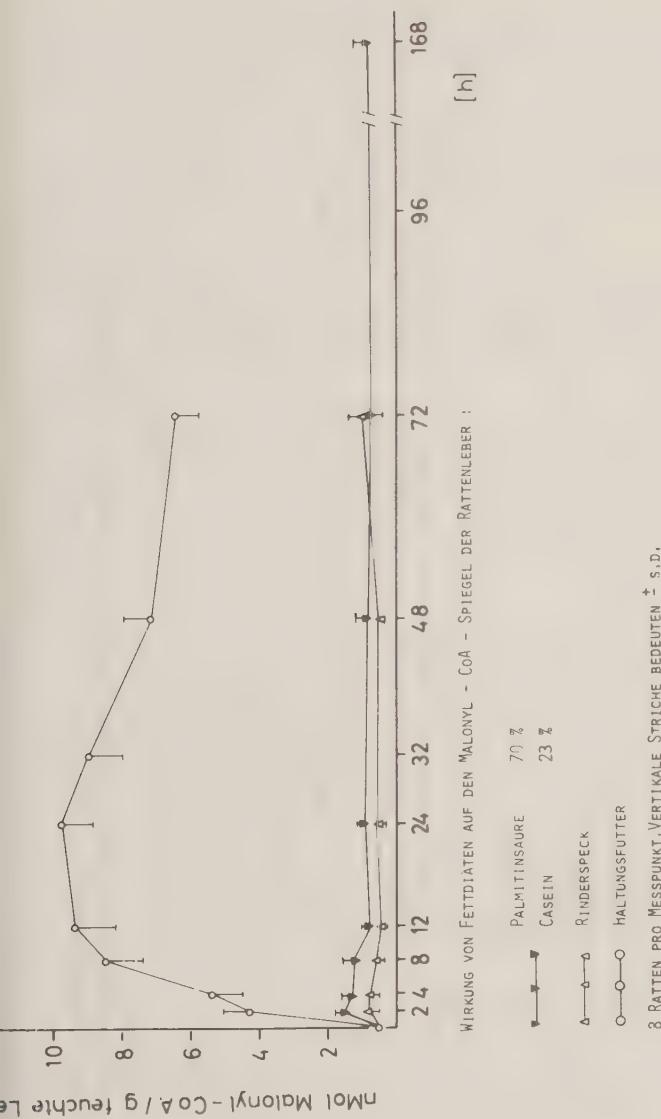


Abb. 23 :

Bedingungen: Die Ratten wurden vor dem Versuch 48 h gehungert bis zu einem Gewicht von 150 - 200 g. Weitere exp. Einzelheiten s. S. 82.

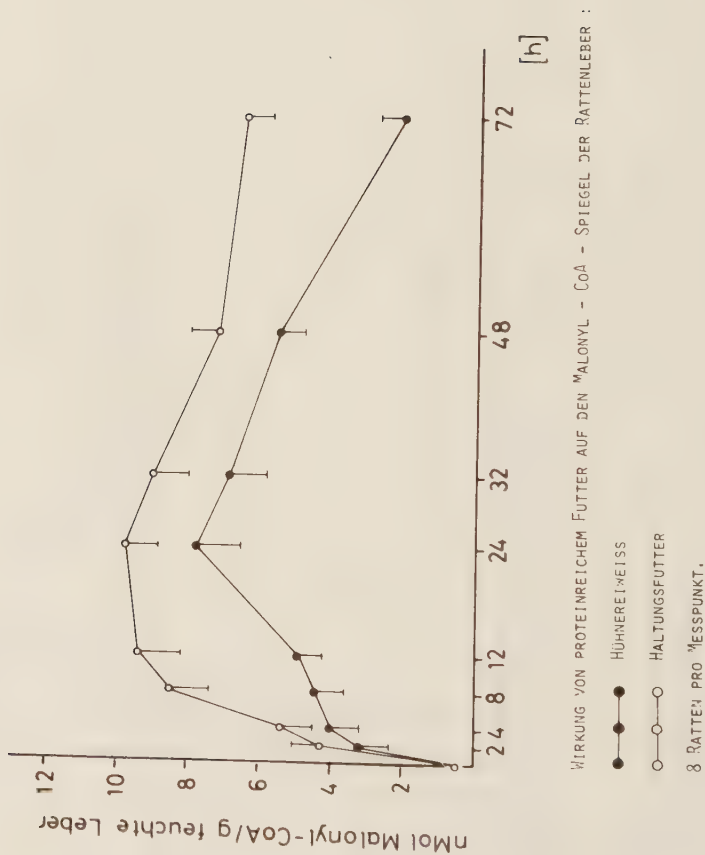


Abb. 24:
Bedingungen: Die Ratten wurden vor dem Versuch 48 h gehungert.
(Exp. Einzelheiten s. S.88).

2.7.7 Proteinfütterung

Bei Wiederfütterung der 48 h gehungerten Ratten mit gestocktem Hühnereiweiß blieb die Malonyl-CoA-Konzentration unter dem der Kontrolltiere und nahm nach 48 h stark ab; gleichzeitig nahm das Gewicht der Tiere ab (Abb. 24). Wie aus den Gewichtstabellen auf S. 90 zu entnehmen ist, war bei allen aufgeführten Wiederfütterungsexperimenten sichergestellt, daß die Tiere das Futter auch tatsächlich zu sich nahmen.

2.8 Der Malonyl-CoA-Gehalt der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen.

Hefe ist ein eukaryontischer Mikroorganismus, der seit den ersten Entdeckungen der Biochemie oft als Modell-Zelle zum Studium von Stoffwechselvorgängen gedient hat. Zwar zählt der stabile Multienzymkomplex aus Hefe zu den bestverstandenen fettsäurebildenden Systemen (5), wie auch die Acetyl-CoA-Carboxylase als homogenes Enzym charakterisiert ist (125,131), doch ist über die Kontrolle der Fettsäuresynthese in Hefe wenig bekannt. Neuere Arbeiten von Numa et al. (126) zeigen, daß, wie bei den Säugetier- und Vogel-Organismen, die Acetyl-CoA-Carboxylase die entscheidende Rolle bei der Regulation der Fettsäuresynthese spielen kann. So ist bei Anwesenheit von Palmitin-, Palmitolein-, Öl-, Linol- und Linsäure der Gehalt an Carboxylase im Kulturmedium erniedrigt. Das Ergebnis immunchemischer Tritrationen zeigt, daß die Abnahme der Enzymmenge mit einer Abnahme der Synthese verbunden ist (127).

Da die Empfindlichkeit des radiochemischen Tests die Bestimmung des Malonyl-CoA-Spiegels in Hefe erlaubte, wurden folgende Mediumbedingungen der unter Stationärbedingungen gehaltenen Bäckerhefe ausgewählt:

- 1) Substrat-Verarmung
- 2) Glucose
- 3) Alkohol und Acetat
- 4) Oktan-, Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Linol-, Linolensäure
- 5) Palmitin-, Stearin-, Linol-, Linolensäure und Glucose

2.8.1 Substrat-Verarmung

Die von der Fa. Sandvoos bezogene Hefe wurde aerob in Anwesenheit von $\frac{M}{15}$ K-PO₄-Puffer pH 6,5 16-20 h verarmt. Da nach Scriba (128) Hefen unter optimalen Mediumbedingungen bis zu 15 g/100 ml Medium wachsen können, wurden, um Stationärbedingungen vorzufinden, jeweils 20 g Hefe/100 ml Lösung in Fernbachkolben geschüttelt. Auch bei Langzeitstudien über 72 h genügte es, Kolben und Puffer-Medium zu sterilisieren; bakterielle Infektionen wurden nicht beobachtet. Bei der so verarmten Hefe sank der Malonyl-CoA-Spiegel auf ca. 50 pmol/g feuchte Zellen ab.

2.8.2 Glucose

Zu den verarmten Hefen wurden unter aeroben Bedingungen 1, 10, 20 % D-Glucose in das Phosphat-Puffer-Medium gegeben. Der Malonyl-CoA-Spiegel hob sich innerhalb weniger Minuten auf bis zu 4 nmol/g feuchte Zellen an und sank parallel zum Verbrauch der Glucose im Medium auf das Ruheniveau ab. Derselbe Kurvenverlauf wurde erhalten, als ein Medium bestehend aus 2 % Bactopepton und 1 % Hefeextrakt verwendet wurde (Abb. 25).

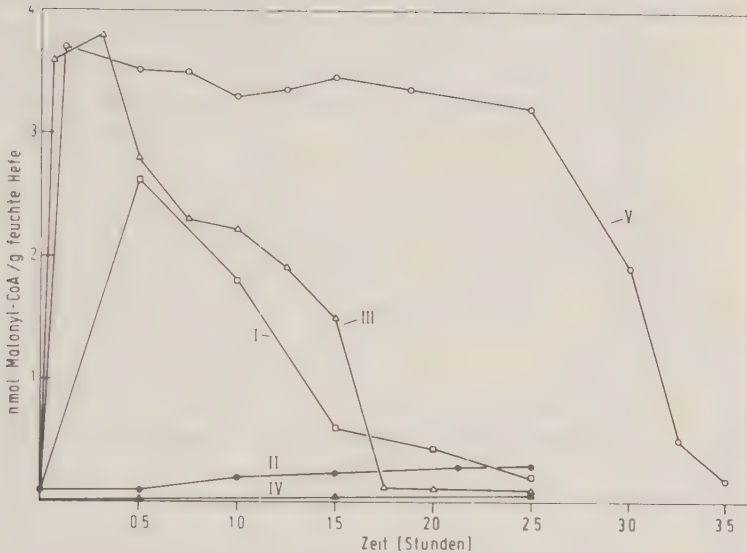


Abb. 25: Der Malonyl-CoA-Gehalt verarmter Hefe nach Zusatz von D-Glucose in das Phosphatpuffer-Medium.

Bedingungen: 40 g 16-20 h verarmt, Hefe in 200 ml $\frac{M}{15}$ K-PO₄-Medium pH 6.5, 150 UPM, 30°C, aerob.

- Kurve I: 2 % Baktopenon, 1 % Hefeextrakt, 1 % Glucose, 40 g Hefe/200 ml Medium
Kurve II: wie I, ohne Glucose.
Kurve III: M/15 K-PO₄/Puffer pH 6,5; 10 % Glucose, 40 g Hefe.
Kurve IV: wie III, ohne Glucose.
Kurve V: wie III, mit 20 % Glucose.

(Weitere exp. Einzelheiten s. S.93).

Daß der relativ schnelle Abfall des Malonyl-CoA-Spiegels tatsächlich mit der Abnahme der Glucose-Konzentration im Medium zusammenfällt, konnte durch eine anschließend wiederholte Glucosegabe gezeigt werden (Abb. 26):

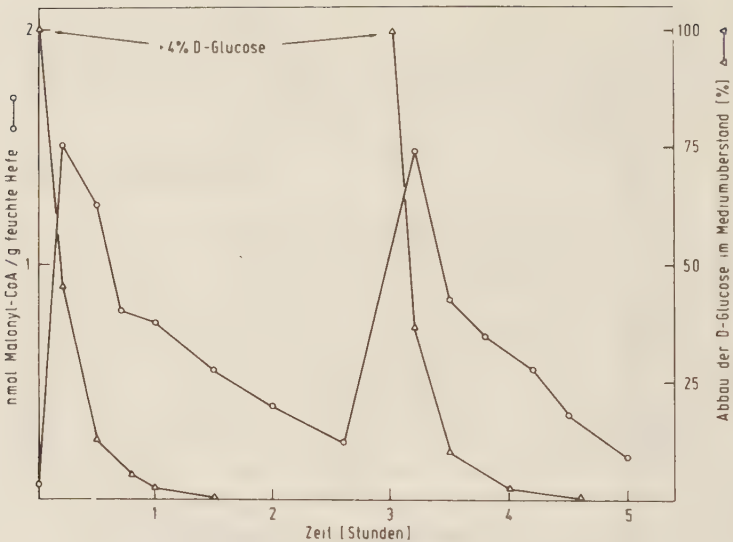


Abb. 26: Der Malonyl-CoA-Gehalt verarmter Hefe und die Glucosekonzentration im Mediumüberstand nach wiederholter Glucose-Gabe.

Bedingungen: 200 ml M/15 K- PO_4 -Puffer pH 6,5 in Fernbachkolben, aerob, 100^4 UPM, 30°C .

Pfeile: + 4 % Glucose. Weitere Einzelh. S. 93.

2.8.3 Alkohol und Acetat

Eine weitere Untersuchung galt der Frage, wie sich der Malonyl-CoA-Gehalt verarmter Hefen bei Anwesenheit von Alkohol, Acetat und einer Mischung aus beiden verhält. Wie Abb. 27 zeigt, macht sich der Einfluß dieser Substrate nur im pmol Bereich bemerkbar. Alkohol wurde aerob von den Hefen kaum aufgenommen, wie die Messung des Mediumüberstandes zeigt: Der Malonyl-CoA-Spiegel bleibt fast unverändert, auch wenn die Alkoholkonzentration von 0.13 M auf 0.26 M erhöht wurde.

Die Verwertung von Acetat geschieht innerhalb der ersten 1,5 h rasch, stagniert anschließend, wobei erst dann der Malonyl-CoA-Spiegel langsam ansteigt. Auch eine Verdopplung der Acetatkonzentration auf 0.441 M hatte keinen Einfluß auf die Größe der Malonyl-CoA-Produktion. Sie wurde aber deutlich stimuliert, wenn Acetat und Alkohol gleichzeitig im Medium anwesend waren (Abb. 27).

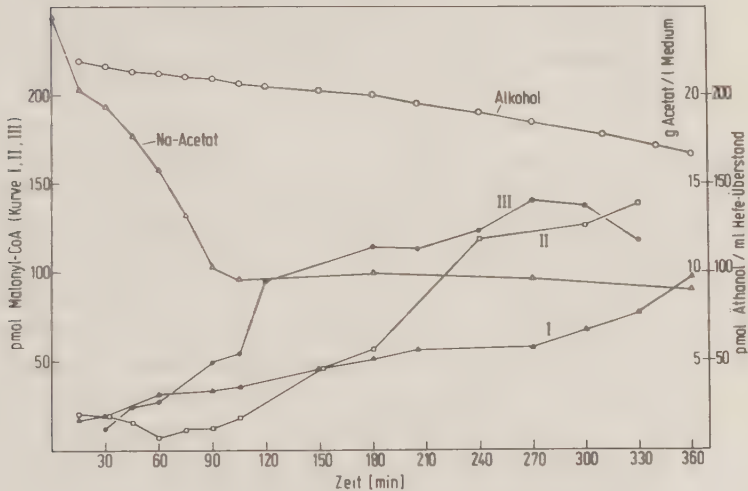


Abb. 27 Der Malonyl-CoA-Gehalt verarmter Hefe nach Zusatz von Alkohol und Acetat und einer Mischung aus beiden.

Bedingungen: 18 h verarmte Hefe, 200 ml M/15 K-PO₄-Puffer pH 6,5; 40 g Hefe, 150 UPM, 30°C aerob.

Kurve I: Zusatz von 1,2 % Äthanol.
Kurve II: Zusatz von 0.441 M Na-Acetat,
Kurve III: Zusatz einer Mischung aus 1,2 % Äthanol und 0.441 M Na-Acetat.

(Experimentelle Einzelheiten s. S. 94)

2.8.4 Oktan-, Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Linol-, Linolensäure

Nach Zusatz von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren im Wachstumsmedium von *Saccharomyces cerevisiae* ist der Acetyl-CoA-Carboxylase-Gehalt verringert (126). Auch haben Humanfibroblasten, wenn sie auf fötalem Kälberserum wachsen, weniger Carboxylase, als wenn die Zellen im lipidfreien Medium wachsen (129). Dieser Effekt kann mit der Gabe von Lipiden in das Serum rückgängig gemacht werden. Analoge Effekte wurden von Triglyceriden und Fettsäuren berichtet, als Rattenhepatocyten in einem lipid- und proteinfreien, synthetischen Medium gehalten wurden (130).

Das Ziel der in diesem und im folgenden Kapitel beschriebenen Versuche war es, den Einfluß von Oktan-, Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Linol- und Linolensäure auf die Malonyl-CoA-Konzentration in Hefezellen bei Anwesenheit von D-Glucose zu untersuchen. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, daß ein hohes Fettsäureangebot Enzyme der Fettsäuresynthese inhibiert. Wenn gleichzeitig Glucose im Medium vorhanden ist, die, wie in Kap. 2.8.2 beschrieben, nach Verarmung eine bis zu 100-fache Steigerung der Malonyl-CoA-Produktion auslöst, sollte in diesem Fall der Malonyl-CoA-Spiegel wegen der durch Fettsäuren oder deren CoA-Ester blockierten Acetyl-CoA-Carboxylase kaum angehoben werden. Voraussetzung dazu ist allerdings, daß Hefen in genügendem Maße Fettsäuren aerob aus dem Medium aufnehmen. Wie Abb. 28 zeigt, verschwinden bei den 18 h verarmten Hefen die radioaktiv markierten Fettsäuren mit folgender Reihenfolge aus dem Medium: Palmitin-, Stearin-, Linolen-, Linol-, Laurin-, Oktansäure. Am schnellsten wurde die Palmitinsäure, jedoch kaum die Oktansäure von den verarmten Hefen aufgenommen.

Um sicherzustellen, daß keine unspezifische Aufnahme der Fettsäuren vorlag, wurde Hefe durch Hitze inaktiviert. Diese Hefe nahm keine Palmitinsäure mehr auf (Abb. 28).

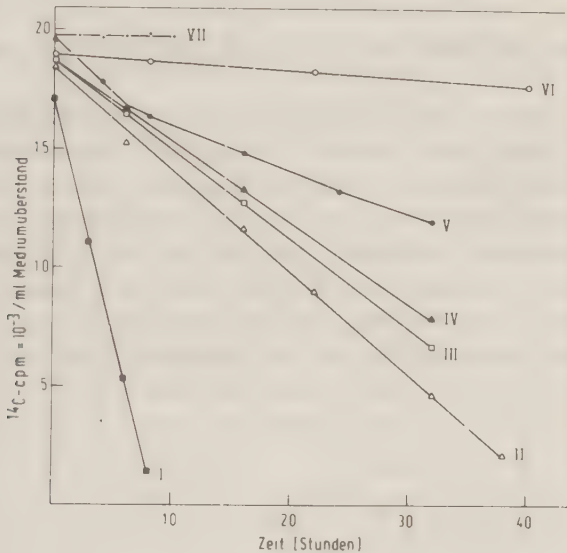


Abb. 28: Fettsäureverbrauch von verarmter Bäckerhefe in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Bedingungen: 10 mM Fettsäuren, 2 % Brij 58, 40 g 16 h verarmte Hefe, 200 ml M/15 K-PO₄-Puffer pH 6,5, 150 UPM, 30° C, aerob. 1 ml Medium-Überstand zur Messung eingesetzt.

Kurve I: U-¹⁴C-Palmitinsäure, 17000 cpm/ml.

Kurve II: 1-¹⁴C-Stearinsäure, 18500 cpm/ml.

Kurve III: 1-¹⁴C-Linolensäure, 18700 cpm/ml.

Kurve IV: 1-¹⁴C-Linolsäure, 18700 cpm/ml.

Kurve V: 1-¹⁴C-Laurinsäure, 19500 cpm/ml.

Kurve VI: 1-¹⁴C-Oktansäure, 19000 cpm/ml.

Kurve VII: Hitzeinaktivierte Hefe mit U-¹⁴C-Palmitinsäure, 19700 cpm/ml.

(Experimentelle Einzelheiten s. S. 94)

Außerdem wurde gefunden, daß die Aufnahme von Palmitinsäure durch 16 h verarmte Hefezellen (40 g Hefe in 200 ml M/15 KPO_4 -Puffer zwischen 0-22 h etwa 1,1 mM, zwischen 22-31 h auf 3,2 mM und zwischen 31-70 h auf 5,0 mM gesteigert werden konnte. Der Malonyl-CoA-Spiegel blieb unter diesen Umständen bis zu 70 h konstant auf dem von verarmten Hefezellen gemessenen Niveau (ca. 50 pmol).

2.8.5 Palmitin-, Stearin-, Linol-, Linolensäure und D-Glucose

Um die im vorigen Kapitel skizzierte Arbeitshypothese zu überprüfen, wurde der ca. 20 h verarmten und anschließend mit Palmitin-, Stearin-, Linol- und Linolensäure versetzten Hefe nach verschiedenen Zeiten 10 % D-Glucose zugegeben. Wie in Abb. 29 zu sehen, stoppt der Palmitinsäure-Verbrauch, sobald Glucose zugegeben wird. Auch nachdem die Hefe die zugesetzte D-Glucose verbrannt hat, bleibt die Konzentration von Palmitinsäure im Mediumüberstand unverändert.

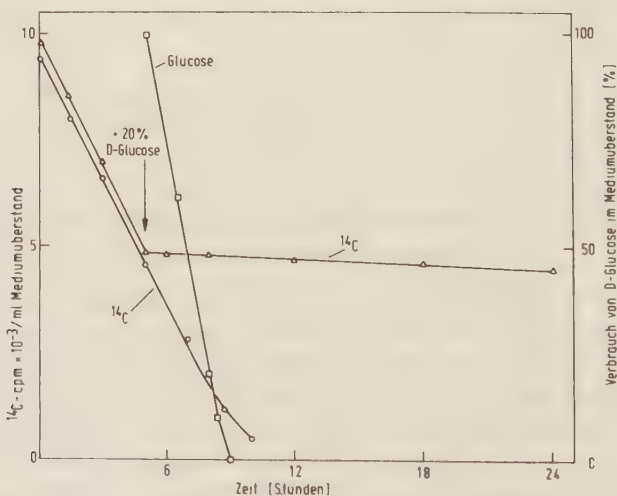


Abb. 29: ^{14}C -Palmitinsäureverbrauch verarmter Bäckerhefe. Nach 5 Std. erfolgte eine Gabe von 20 % D-Glucose. Bedingungen: 40 g 16 h verarmte Hefe/200 ml M/15 K-PO_4 -Puffer pH 6,5; 10 mM Palmitinsäure, 2 % Brij 58, 150 UPM, 30°C, aerob.

Überraschenderweise wurde keinerlei Einfluß auf den Malonyl-CoA-Spiegel im Vergleich zu den Kontrollproben ohne Fettsäuren festgestellt, als die verarmte Hefe 45, 180 und 660 min mit Palmitinsäure vorinkubiert wurde und anschließend 10 % D-Glucose zugegeben wurden (Abb. 30).

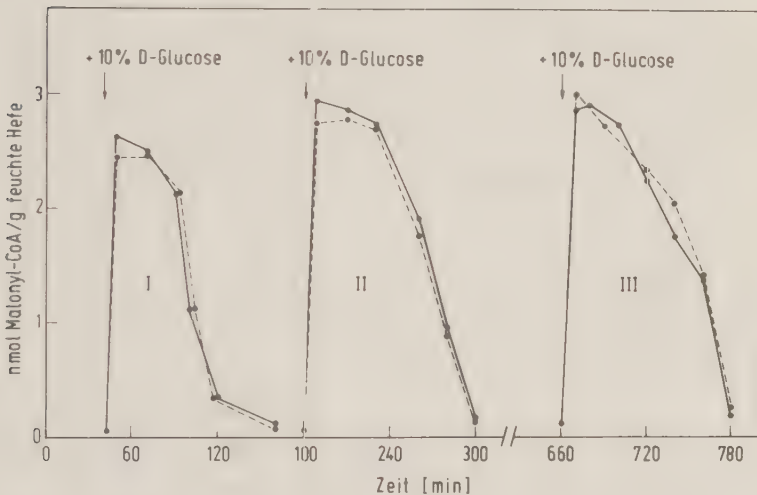


Abb. 30: Der Malonyl-CoA-Spiegel 18 h verarmter Hefe in Anwesenheit von 10 % D-Glucose (s. Pfeile). Zur Zeit Null und nach 8 h wurde 10 mM Palmitinsäure zugegeben.

Ausgezogene Linien: Medium mit Palmitinsäure
Gestrichelte Linien: Medium ohne Palmitinsäure

Bedingungen: je 10 mM Palmitinsäure, 40 g Bäckerhefe / 200 ml M/15 K-PO₄-Puffer pH 6,5, 150 UPM, 30° C, aerob.

Kurvenpaar I: Nach 45 min Palmitinsäurevorinkubation + 10 % D-Glucose.

Kurvenpaar II: Nach 180 min Palmitinsäurevorinkubation + 10 % D-Glucose.

Kurvenpaar III: Nach 660 min Palmitinsäurevorinkubation + 10 % D-Glucose.

Erst nachdem die Vorinkubation mit Palmitinsäure auf 16 h erweitert wurde, stieg nach Start mit 10 % D-Glucose der Malonyl-CoA-Gehalt dieser Hefezellen auf 5 nmol/g Feuchtgewicht an. Ebenso erhöhte sich der Malonyl-CoA-Spiegel nach 28 stündiger Inkubation mit Linol- und Linolensäure vor der Glucose-Gabe auf 8 nmol/g feuchte Hefe (Abb. 31).

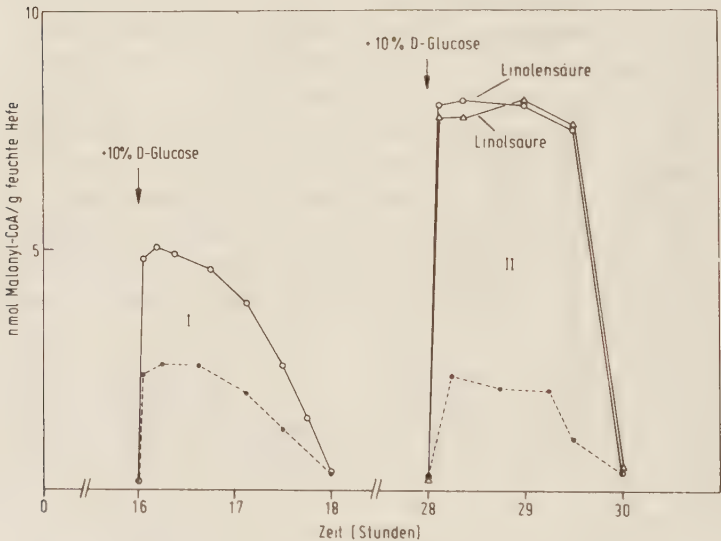


Abb. 31: Der Malonyl-CoA-Spiegel 18 h verarmter Bäckerhefe nach Gabe von 10 % D-Glucose (s. Pfeile). Zur Zeit Null und nach 10 h wurden beim Kurvenpaar I 10 mM Palmitinsäure, beim Kurvenpaar II 10 mM Linol-, bzw. 10 mM Linolensäure zugegeben. Ausgezogene Kurven: Vorinkubation mit Fettsäuren. Gestrichelte Kurven: Ohne Vorinkubation mit Fettsäuren.

Bedingungen: 40 g Bäckerhefe/200 ml M/15 K- PO_4 -Puffer pH 6,5, 150 UPM, 30° C, aerob.

Kurvenpaar I : Nach 16 h Inkubation mit Palmitinsäure Start mit 10 % D-Glucose.

Kurvenpaar II : Nach 28 h Inkubation mit Linol- bzw. Linolensäure, Start mit 10 D-Glucose.

(Weitere Einzelheiten s. S. 95).

Sehr drastisch wirkte sich die 72 stündige Vorinkubation mit Palmitin- bzw. Stearinsäure auf den Malonyl-CoA-Gehalt der Bäckerhefe aus (Abb. 32):

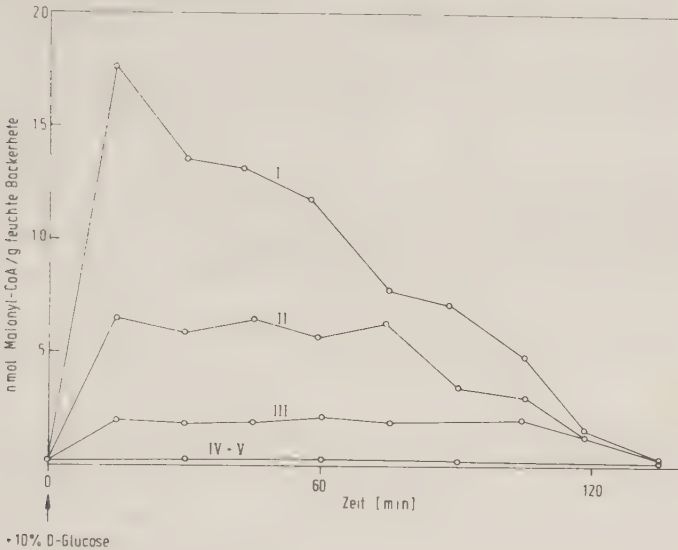


Abb. 32: Der Malonyl-CoA-Spiegel 18 h verarmter, anschließend 72 h mit Palmitin- oder mit Stearinsäure vorinkubierter Bäckerhefe. Zur Zeit Null wurden 10 % D-Glucose zugegeben (s. Pfeil).
Bedingungen: 40 g Bäckerhefe, 200 ml M/15 K-PO₄-Puffer pH 6,5; 150 UPM, 30° C aerob. Nach 16 h⁴ Verarmung wurden alle 24 h je 10 mM Fettsäuren zugegeben.
Kurve I: Nach 72 h Vorinkubation mit Palmitinsäure Gabe von 10 % D-Glucose (t=0).
Kurve II: Nach 72 h Stearinsäurevorinkubation Gabe von 10 % D-Glucose (t=0).
Kurve III: Kontrolle, Medium 72 h, ohne Palmitin-, bzw. Stearinsäure, anschließend + 10 % D-Glucose.
Kurve IV: 72 stündige Palmitinsäureinkubation ohne Glucose
Kurve V : 72 stündige Stearinsäureinkubation ohne Glucose.

Der nach 72 Stunden erfolgte Zusatz von 10 % D-Glucose in das Medium trieb den Malonyl-CoA-Spiegel der mit Palmitinsäure vorbehandelten Hefe auf 17,5 nmol/g feuchte Zellen, im Fall der Stearinsäure-Vorinkubation auf 6 nmol/g Feuchtgewicht. Bei den als Kontrolle ohne Fettsäuren vorinkubierten Hefezellen stieg der Malonyl-CoA-Gehalt nach Glucose-Gabe etwas weniger als üblich auf 2 nmol/g feuchte Zellen an. Auf dem Niveau verarmter Hefezellen blieb der Malonyl-CoA-Spiegel, als im Puffer-Medium nur die jeweiligen Fettsäuren zugegen waren. Derselbe Befund wurde erhalten, als 120 h mit Palmitin- oder Stearinsäure vorinkubiert wurde.

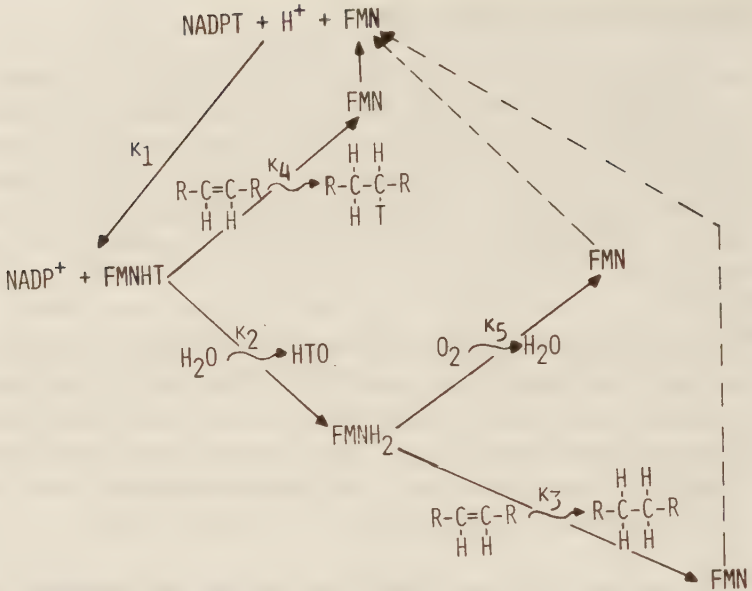
3. Zusammenfassende Diskussion

Wir konnten zeigen, daß bei der Inkubation der Mischung aus Fettsäuresynthetase, Acetyl-CoA und Malonyl-CoA mit $B-^3H$ -NADPH neben tritiierten Fettsäuren auch tritiiertes Wasser entsteht. Das erwartete 2:1 Verhältnis von NADPH zu Malonyl-CoA berechnet auf die Anzahl der Mole Tritiumatome pro Mol vorgelegtes Malonyl-CoA betrug nur 1:0.70-0.90.

Dies kann als Konsequenz der Testbedingungen angesehen werden: Die Substratkonzentration von NADPH, die fast 500-fach unter dem K_M lag, kann zu einer auch bei anderen Enzymsystemen beobachteten TAL-Bildung führen (157,158), wobei ein Teil der Malonyl-CoA Menge abgefangen wird und nicht zur Fettsäuresynthese zur Verfügung steht.

Als weitere Erklärung kann unser Befund herangezogen werden, der zeigt, daß die Tritiumwasserbildung aus $B-^3H$ -NADPH vom Flavin, das an die Fettsäuresynthetase der Hefe gebunden ist, abhängig war. Inkubierte man FMN mit $B-^3H$ -NADPH alleine, so ließ sich ebenso wenig Tritiumwasser nachweisen wie bei der Inkubation von FMN freier Fettsäuresynthetase mit Malonyl-CoA, Acetyl-CoA und $B-^3H$ -NADPH. Wenn allerdings mit FMN reaktivierter Fettsäuresynthetase inkubiert worden war, erhielt man wie mit dem nativen Enzym die Tritiumwasser- und die Tritiumfettsäurenbildung.

Als Zusammenfassung der im experimentellen Teil eingehend beschriebenen Mechanismen mögen die im Schema 1 gezeigten Zusammenhänge dienen:



Schema 1: Die vom Flavin abhängige Oxidation des $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ im Verlauf der zweiten Reduktion der Fettsäuresynthetase-Reaktion.

Ohne CoA-haltige Substrate nur mit $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ und Fettsäuresynthetase alleine laufen die sehr begünstigte Beladung des FMN mit Wasserstoff aus NADPH (k_1), die Tritiumwasserstoff-Austauschreaktion mit dem Inkubationswasser (k_2), und die Oxidation des Leukoflavins zum Flavin durch Luftsauerstoff (k_5) ab. Als Produkte dieses Reaktionszyklus entstehen aus dem vorgelegten $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ Tritiumwasser und NADP^+ .

Bei der Fettsäuresynthese mit allen Substraten tritt die Reduktion der Enoyl-Doppelbindung durch die Reaktionen k_4 und k_3 hinzu. Da wir nur ein statt zwei Tritiumwasserstoffe pro C_2 -Baustein in Fettsäuren fixieren konnten, schließen wir auf einen $\text{FMNHT} / \text{FMNH}_2$ Austausch (k_2) der schneller ist als die Reduktion einer Enoyl-Doppelbindung mit Tritium-Flavin (k_4). Auf Grund der Reaktionsprodukte

tritt bei kompletten Synthesebedingungen die Oxidation des NADPH durch Luftsauerstoff in den Hintergrund, daher kann man folgende Reihenfolge der Reaktionsgeschwindigkeiten aufstellen:

$$k_1 > k_2 > k_3 > k_4 > k_5$$

Die Problematik der Tritiumwasserbildung, der inkompletten Substratsstöchiometrie und der auf 26 - 30 % der Theorie erniedrigten Einbaurate von Tritiumwasserstoff aus NADPH ist für die Zuverlässigkeit der radiochemischen Methode zur Malonyl-CoA-Bestimmung ohne Belang, da dieser Test nicht auf Messung des Verbrauchs an B-³H-NADPH, sondern auf Messung der Bildung tritiiertter Fettsäuren beruht.

Anhand der in den Tierversuchen gewonnen Ergebnisse lassen sich deutliche Parallelen zwischen der von Nakanishi und Numa (44,45) untersuchten Acetyl-CoA Carboxylase-Aktivität und der Malonyl-CoA-Konzentration in der Rattenleber feststellen. Die Stationärkonzentration dieses Metaboliten, die im Normalzustand 180 - 220 g schwerer Ratten durchschnittlich 6 - 7 nmol/g feuchte Leber betrug, zeigte eine deutliche Abhängigkeit von regulatorischen Einflüssen: die Ratten nahmen nachts ca. 70 % ihres Futter zu sich; bei gleichzeitig gesteigerter Lipogenese (108,109) stieg der Malonyl-CoA-Gehalt um 35 % an. Diese Beobachtung führte zu der Konsequenz, daß, um vergleichbare Resultate zu erhalten, die Schlachtung der Ratten immer zum selben Zeitpunkt stattfinden mußte.

Im Hunger sank der Malonyl-CoA-Spiegel in Verbindung mit der verringerten Lipogenese auf 8 % des bei normal gefütterten Tieren gefundenen Wertes. Die Acetyl-CoA- und die Citratkonzentrationen blieben im Cytosol nach den Kompartimentierungsstudien von Siess et al. (123,153) in iso-

lierten Leberzellen gehungerter und gefütterter Ratten weitgehend unverändert. Diese Leberzellen wurden vor den Metabolitmessungen jeweils mit Laktat inkubiert, um die nach der Isolierung durch eine modifizierte Digitonin-Methode abgesunkenen Konzentrationen der Schlüsselmetabolite auf das Niveau der mit der Frierstopfmethode gefundenen Werte anzuheben. Abb. 33 faßt die von Siess et al. (123, 153) und die von uns gefundenen Werte zusammen:

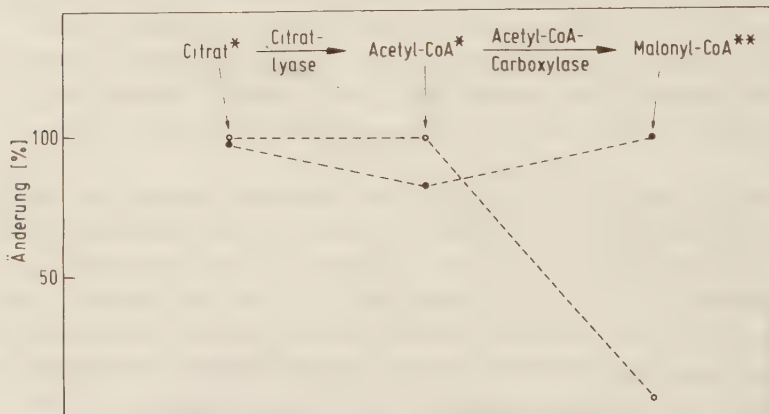


Abb. 33: Konzentrationen von Citrat, Acetyl-CoA im Cytosol und von Malonyl-CoA in der Gesamtzelle in Lebern gefütterter und gehungerter Ratten.

* entnommen aus (123,153), Digitonin-Fraktionierung.

** eigene Messungen, Frierstopfmethode.

offene Kreise : gehungerte Ratten

Punkte : normal gefütterte Ratten.

Aus dem Vergleich muß man zu dem Schluß kommen, daß die Stationärkonzentrationen des Malonyl-CoA in der Leber in erster Linie durch die Syntheserate und nicht durch die Verbrauchsrate dieses Metaboliten bestimmt werden, wobei als Regulationsenzym der Acetyl-CoA-Carboxylase entscheidende Bedeutung zukommt.

Da bekannt ist, daß Fettsäuren, bzw. deren CoA-Ester die Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität erniedrigen (38,39), wurde in einem weiteren Experiment gehungerten Ratten Fett gefüttert mit dem Ergebnis, daß der Malonyl-CoA-Spiegel bis zu 168 h fast unverändert auf niedrigem Niveau blieb. An dieser Stelle sollen aber Versuche von Siess et al. (123) nicht verschwiegen werden, die folgende Befunde veröffentlichen: Wurden isolierte Hepatocyten gehungerter Ratten mit Oleat inkubiert, so ließ sich im cytoplasmatischen Raum weder Acetyl-CoA noch Citrat nachweisen, während in der Mitochondriumfraktion der Acetyl-CoA-Gehalt im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf das 3-fache anstieg, und die Citrat-Menge etwa konstant blieb. Als Schlußfolgerung dieser Ergebnisse liegt eine Blockierung des Citrattransportes vom mitochondrialen in den cytoplasmatischen Raum nahe. Weitere Arbeiten von Siess et al. (153) stellen die Bedeutung dieser Experimente allerdings in Frage: Wurden nämlich Hepatocyten normal gefütterter Ratten mit Oleat inkubiert, so sank der cytosolische Acetyl-CoA-Spiegel nur um das 0.6 - fache, während der cytosolische Citrat Spiegel fast verdoppelt wurde. Im mitochondrialen Raum kam es unter diesen Bedingungen zu einer Steigerung sowohl der Acetyl-CoA-Konzentration um das 1.8 fache wie auch der Citratkonzentration um das 1.4 fache. Würde man zur Interpretation unseres Wiederfütterungsversuches gehungerter Ratten mit Fett einerseits nur die Daten von Siess et al. (123) heranziehen, die mit gehungerten Tieren erhalten wurden, so könnten wir die Senkung des Malonyl-CoA-Spiegels nicht nur auf eine Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase, sondern auch auf eine Blockierung

des Citrattransportes zurückführen. Andererseits müssen auch die obiger Interpretation widersprechenden Resultate berücksichtigt werden. Diese ungeklärten und noch nicht bestätigten Befunde von Siess et al., veranlaßten uns experimentelle Bedingungen zu suchen, die sicherstellen, daß bei gleichzeitig hohen cytosolischen Acetyl-CoA-Mengen die Acetyl-CoA-Carboxylase der Rattenleber gehemmt werden kann. Diese experimentellen Voraussetzungen konnten in der Tat geschaffen werden, wenn man gehungerte, alkoholisierte Ratten mit Fett wiederfüttert, wobei folgende Überlegungen notwendig sind:

Aus Arbeiten des Labors von Decker (155,156) ist bekannt, daß die Acetyl-CoA-Synthetase (Acetat:CoA Ligase (AMP) EC 6.2.1.1.) in der Rattenleber zu 80 % in der cytosolischen Fraktion gefunden wird. Die Aktivität dieses Enzyms übersteigt bei normal gefütterten, wie bei gehungerten Ratten sowohl die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase, als auch die Aktivität der Fettsäuresynthetase beträchtlich (79). Es ist also sichergestellt, daß das Acetat aktivierende Enzym im Cytosol unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen nicht den limitierenden Schritt der Fettsäuresynthese darstellt. Dies bedeutet, daß bei genügend großer Alkologabe das bei der Oxidation des Alkohols freiwerdende Acetat zu Acetyl-CoA aktiviert werden kann und dann im Cytoplasma zur Fettsäuresynthese bereitsteht. Siess et al. (123) konnten an isolierten Hepatocyten gehungerter Ratten tatsächlich zeigen, daß der Acetyl-CoA-Gehalt im Cytosol bei Gabe von Alkohol um 30 % gegenüber unbehandelten Ratten anstieg. Füttert man nun gehungerte, alkoholisierte Ratten mit Speck, so wird man im Wissen der genannten experimentellen Daten fordern, daß der cytosolische Acetyl-CoA-Gehalt die Konzentration normal gefütterter Tiere erreicht oder sogar übersteigt. Wenn aber durch die gleichzeitige Gabe von Fett die Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase gehemmt ist (38,39), wird trotz ausreichendem Acetyl-CoA-Angebot der Malonyl-CoA-Spiegel nicht das Niveau der im Parallelversuch mit

Normalfutter gefütterten Ratten erreichen. Diese Erwartung wurde durch das Experiment bestätigt: Wir fanden, daß der Malonyl-CoA-Gehalt der Rattenlebern gehungerter, alkoholisierten und mit Speck wiedergefütterter Tiere bis zu 72 h auf niedrigem Niveau blieb und nicht den überproportionalen Anstieg der gehungerten, alkoholisierten und mit Normalfutter gefütterten Tiere zeigte.

Als gehungerte Ratten mit kohlenhydratreichem Futter wiedergefüttert wurden, stieg der Malonyl-CoA-Gehalt deutlich über den der mit Normal-Futter gefütterten Tiere an. Offensichtlich übersteigt die Synthese von Malonyl-CoA die der gesättigten langkettigen Fettsäuren, ein Befund, der wiederum die regulatorische Schlüsselfunktion der Acetyl-CoA-Carboxylase untermauert.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit galt der Frage, wie sich der eukariontische Organismus Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*, bei verschiedenen Stoffwechselbedingungen bezüglich des Malonyl-CoA-Spiegels verhält. Zunächst wurde festgestellt, daß bei verarmerter Hefe die Gabe von D-Glucose eine fast 100-fache Steigerung des Malonyl-CoA-Gehaltes auf 2-3 nmol/g feuchte Zellen bewirkt. Diese Konzentrationsdifferenz wurde bei keinem Stoffwechselexperiment mit Ratten beobachtet. Getragen von der Hoffnung, daß Fettsäuren, bzw. deren CoA-Ester die Acetyl-CoA-Carboxylase hemmen, wurden Inkubationen mit langkettigen Fettsäuren durchgeführt. Die Vermutung, daß bei anschließender Glucosegabe der Malonyl-CoA-Gehalt nicht das hohe Niveau der im Kontrollversuch ohne Fettsäuren vorinkubierten Hefe erreichen sollte, wurde nicht erfüllt. Vielmehr trat der gegenteilige Effekt auf, denn nach genügend langer Vorinkubation mit Fettsäuren wurde der Malonyl-CoA-Spiegel nach Gabe von Glucose auf selbst im Tierexperiment nicht erreichte Höhen getrieben. Ebenso in diesem Sinne wirksam erwiesen sich Linol- und Linolensäure, die in Hefen gewöhnlich nicht vorkommen (157).

Wahrscheinlich wird unter diesen Bedingungen die Fettsäuresynthetase der Hefe regulatorisch eher ausgeschaltet als die Acetyl-CoA-Carboxylase, sodaß sich der beobachtete Konzentrationsstau an Malonyl-CoA ausbilden kann. Dieses von Hefen in der Stationärphase erhaltene Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu dem von Numa et al. (126) veröffentlichten Befunden, die fanden, daß exogenen Fettsäuren den Acetyl-CoA-Carboxylase-Gehalt wachsender *Saccharomyces cerevisiae* durch verlangsamte Enzym-Synthese (127) absenken.

4 Experimenteller Teil

4.1 Geräte

Varian Aerograph 1700 mit Schreiber Modell 20

Zentrifuge 8 x 1350, Stock Marburg

Automatic Superspeed Centrifuge, Sorvall RC 2 B, Rotoren
GS 3, GSA, SS 34.

Sorvallbecher, Polycarbonat, Kat. Nr. 270, Polypropylen,
Kat. Nr. 252, mit entsprechenden Adaptoren
für Rotor SS 34

Präparative Ultrazentrifuge Beckmann, Spinco L, Rotor 40
pH-Meter, Knick, Berlin, Typ 27, mit Ingold Einstabmeß-
kette 405 - M5

Photometer Eppendorf 1101 M mit Küvettenwechselautomatik
2705 und Schreiber 6511

Eppendorf Tischzentrifuge 3200, Netheler und Hinz

Eppendorf Mikroliter-Pipetten und Reaktionsgefäße

Eppendorf Reagenz-, und Probendosierer.

Hamilton Mikroliterpipetten 10, 25, 50, 100, 250 µl, 1 ml,
5 ml, 10 ml. Kat. Nr. 702

Hamilton reproduzierbare Dosiervorrichtung

Pipetman, Gilson, Frankreich

Mikrodismembrator, B. Braun, Melsungen

Ultraschall-Homogenisator Branson, Modell S 75 mit
Mikrospitze

Flüssigkeitsszintillationsspektrometer, Mark II, Nuclear
Chicago

Frierstopzange, Eigenbau Moosbauer

Tiefkühltruhe für Betrieb mit fl. N₂, MVE Cryogenics,
New Prague, Minnesota, USA, Modell VPS-3500

Analysenwaage, digital, oberschalgig, Mettler P 200

Fraktionskollektor LKB Ultro-Rac

Schlauchpumpe LKB Varioperpex

UV-Durchflußmonitor LKB Uvicord II mit Zwei-Kanalschreiber

Whirlmix Cenco

Dünnschichtscanner, Frieseke-Hoepfner LB 272 mit
Dual Ratemeter-Integrator LB 242.

4.2 Substanzen

Handelsmaterialien: Enzyme und Coenzyme, Oxalessigsäure, sofern nicht eigens aufgeführt (Boehringer, Mannheim); Guanidin-HCL (Fluka, Buchs); 2-Mercaptoäthanol (Roth, Karlsruhe); Serumalbumin vom Rind (Behringwerke, Marburg); Dithiothreitol (Calbiochem., San Diego), Dowex AG 1X4, 100-200 mesh, Cl⁻-Form (Biorad, Richmond); Al₂O₃ basisch (ICN-Woelm, Eschwege); Stickstoff und Helium nachgereinigt (Linde, München); Dimilume 30, Soluene 350, PPO, Dimethyl-POPOP (Packard, Frankfurt); Unisolve I (Zinsser, Frankfurt); D-1-³H-Glucose, U-¹⁴C-Palmitinsäure, 1-¹⁴C-Caprinsäure, 1-¹⁴C-Oktansäure, 1-¹⁴C-Caprinsäure, 1-¹⁴C-Laurinsäure, 1-¹⁴C-Myristinsäure, 1-¹⁴C-Palmitinsäure, 1-¹⁴C-Stearinsäure, 2-¹⁴C-Malonyl-CoA, ³H und ¹⁴C-Standard-Lösungen (The Radiochemical Centre, Amersham); Depot-Insulin "Hoechst" vom Rind (Hoechst AG, Frankfurt-Hoechst); isotone Kochsalzlösung, steril (Fresenius, Wiesbaden), Brij 58, Tween 40 (Serva, Heidelberg); Alloxan (Sigma, München); Bactopepton, Yeast-Extract (Difco-Laboratories, Detroit, USA). Die übrigen Chemikalien, sowie die Dünnschichtplatten stammen von E. Merck, Darmstadt, bzw. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, und besaßen die höchste erhältliche Reinheit.

Bierhefe wurde freundlicherweise von der Löwenbrauerei AG, München, zur Verfügung gestellt. Bäckerhefe wurde von der Fa. Sandvoss, München 50, bezogen.

Nach Literaturvorschriften wurden synthetisiert:
Acetyl-CoA (132), Gehaltsbestimmung nach (133);
Malonyl-CoA (134), Gehaltsbestimmung nach (135);
Calciumphosphatgel wurde nach (136) hergestellt.

4.3 Allgemeine analytische Methoden

4.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Biuretmethode von Beisenherz (137) mit dem Faktor = 8,6 (138). Verdünnte Proteinlösungen wurden routinemäßig nach der Methode von Warburg und Christian (139) bestimmt.

4.3.2 Radioaktivitätsmessung

^{14}C und ^3H -Messungen wurden im Scintillationszähler ausgeführt. Zählungen erfolgten in homogener Phase. Die Radioaktivität wässriger Lösungen wurde in 10 ml Unisolve I, die von organischen Lösungen in 10 ml Toluol-scintillationslösung gemessen. Radioaktive Protein-niederschläge wurden mit 1 ml Soluene 350 und 0.1 ml H_2O aufgelöst und in 10 ml Dimilume 30 gezählt.

Toluolszintillationslösung (lichtgeschützte Flasche):
1 L Toluol p.a. enthielt 4 g PPO und 0.2 g Dimethyl-PCPOP. Die Absolutmessung radioaktiver Zerfälle erfolgte nach der Methode des externen Standards (AES channels ratio; 140, 141). Eichkurven wurden unter Verwendung von radioaktiven Toluolstandardlösungen gewonnen.

4.4 Ratten und Standarddiät

Die Ratten waren männliche Sprague-Dawley mit einem Gewicht von 150-400 g und wurden von der Fa. Wiga, 8741 Sulzfeld, bezogen. Sie wurden mit der Altromin-Kontrolldiät 1000 gefüttert (Fa. J. Stettner, München). Die Tiere wurden maximal zu viert in Makrolonkäfigen mit der Grundfläche 36 x 20 cm gehalten. Die Käfige befanden sich in einem fensterlosen, klimatisierten Raum mit einer Temperatur von 23°C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 %. Um 7 Uhr MEZ wurde die Beleuchtung automatisch ein- und um 19 Uhr MEZ ausgeschaltet. Die Ratten wurden während der Hellperiode so wenig wie möglich gestört. Alle Tiere wurden zur Adaption an die Umgebung nach Lieferung mindestens fünf Tage unter diesen Bedingungen gehalten, bevor mit den Experimenten begonnen wurde.

4.5 Isolierung und Aktivitätsbestimmung von FSS

FSS wurde aus Bierhefe der Löwenbrauerei München, nach der Vorschrift von Lynen (142) unter Berücksichtigung der von Schreckenbach (143) und Hess (144) angegebenen Veränderungen angereichert. Die Aktivitätsmessung erfolgte im Standard-Enzymtest und betrug 2400-2800 mE/mg.

Eine Küvette ($d = 1$ cm) enthielt in einem Volumen von 1 ml: 1 μmol K-PO_4 -Puffer pH 6.5, 0.2 mg Serumalbumin, 0.07 μmol Acetyl-CoA, 0.2 μmol NADPH, 1 μmol Dithiothreitol und 4-8 μg FSS. Nach Verfolgung des Blindlaufes über zwei Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.1 μmol Malonyl-CoA gestartet. Meßgröße war die Extinktionsänderung bei 334 nm ($T = 25^\circ\text{C}$). NADPH , 334 nm = 6.18×10^6 (145). 1 mE FSS katalysiert den Umsatz von 2 nmol NADPH pro Minute, was der vollständigen Reduktion einer C_2 -Einheit (1 Malonyl-Rest) entspricht. Das Enzym wurde

als 90 %-ige Ammonsulfat-Suspension in 0.1 M K-PO_4 -Puffer pH 6.5, 1 mM Dithiothreitol, 0.5 mM K-EDTA bei -18°C aufbewahrt.

4.6 Seitenspezifität der Hydridübertragungsreaktion der Fettsäuresynthetase aus Hefe

Um die Stereospezifität der Fettsäuresynthetase aus Hefe bezüglich der 4-Position des NADPH untersuchen zu können, wurde eine Probenreihe zur Hälfte mit (4R)- und die andere zur anderen Hälfte mit (4S)-4- ^3H -NADPH versetzt. Zur Darstellung der beiden Stereoisomeren wurde das Verfahren von Siedel (94) angewendet. Die Inkubationen enthielten: 100 μmol K-PO_4 -Puffer pH 6.5, 0.2 mg Serumalbumin, 10 nmol Acetyl-CoA, 40 μg FSS. Die eine Probenreihe wurde mit je 10 nmol (4R)-, die andere mit je 10 nmol (4S)-4- ^3H -NADPH (je 0.25 μCi) versetzt. Anschließend wurden zu jeder Probenreihe 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, bzw. 50 μl einer Malonyl-CoA-Lösung (1 nmol/10 μl) zugegeben. Das Probenvolumen war mit dest. H_2O auf 1 ml aufgefüllt. Nach ca. 30 min Inkubation bei 25°C wurden die Acyl-CoA-Thioester mit 50 μl 4 N KOH bei 85°C 15 min verseift. Je 200 μl einer alkoholischen Lösung, die 1- ^{14}C -Palmitinsäure (ca. 28000 DPM) als Extraktionsstandard und ca. 1 mM Palmitinsäure als Extraktionsträger (Kap. 4.10) enthielt, wurden jeder Inkubation zur quantitativen Bestimmung des Tritiumeinbaus in die enzymatisch gebildeten Fettsäuren hinzugefügt (Eppendorf Reagenzdosierer, Standardabweichung 1 %). Nach Ansäuern mit 100 μl 12 N H_2SO_4 wurden die freien Fettsäuren einmal mit je 2 ml Petroläther (Siedepunkt $40-60^\circ\text{C}$) mit dem Whirlmix extrahiert. Der Petroläther wurde eingedampft, ohne weitere Aufarbeitung mit Toluolszintillationslösung versetzt und die Radioaktivität der Probe bestimmt. Eine Reinigung

des Petroätherextraktes erübrigte sich, da nur ca. 1.5 % nichtspezifische Radioaktivität vom Petroäther mitgerissen wurde.

4.7 Enzymatische Synthese von (4S)-4-³H-NADPH aus D-1-³H-Glucose zur radiochemischen Malonyl-CoA-Bestimmung

Zur Synthese von tritiiertem B-³H-NADPH für eine Testreihe mit 200 Proben wurden in eine Plastik-Monoküvette (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert: 111 µmol Triäthanolaminpuffer pH 7.5, 1.5 µmol MgSO₄, 60 nmol ATP, 50 nmol D-1-³H-Glucose (4-8.3 Ci/mmol), 75 nmol NADP⁺. Nach 2-minütiger Registrierung des Blindlaufes wurde durch Zugabe von 20 µl einer Suspension aus HK/G-6-P-DH (je 1 mg/ml) die Reaktion gestartet und die Bildung von B-³H-NADPH photometrisch verfolgt. Meßgröße war die Änderung der Extinktion bei 334 nm (25 ° C). Nach 30-45 min kam die Reaktion mit 60 % Umsatz zum Stillstand (Küvette mit Parafilm verschlossen). Die Enzyme wurden durch 3 min Erhitzen auf 85 ° C inaktiviert; anschließend wurde die Inkubation rasch im Eisbad abgekühlt. Ohne weitere Aufarbeitung stellte diese Inkubation eine gebrauchsfertige Lösung des B-³H-NADPH dar. 5 µl enthielten je nach Ansatz durchschnittlich 150 pmol (4S)-4-³H-NADPH mit 0.594 µCi.

4.8 Reinigung des (4S)-4-³H-NADPH

Für die in Kap. 2.4 beschriebenen Versuche wurde das aus D-1-³H-Glucose dargestellte (4S)-4-³H-NADPH gereinigt. Die von Boehringer, Mannheim, angegebene chromatographische Reinigung (146) wurde wie folgt geändert: Eine 1 x 18 cm Serva-Säule wurde mit Dowex-Harz 1X4,

100-200 mesh, Chlorid-Form, gefüllt und mit 0.4 M HCO_2NH_4 in 20 % i-Propanol pH 8.5 äquilibriert. 600 μl des nach Kap. 4.7 dargestellten $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ wurden aufgetragen und mit einem linearen Gradienten, bestehend aus 250 ml 0.4 M HCO_2NH_4 in 20 % i-Propanol pH 8.5 und 250 ml 2.5 M HCO_2NH_4 in 50 % i-Propanol pH 8.5, eluiert (Abb. 34).

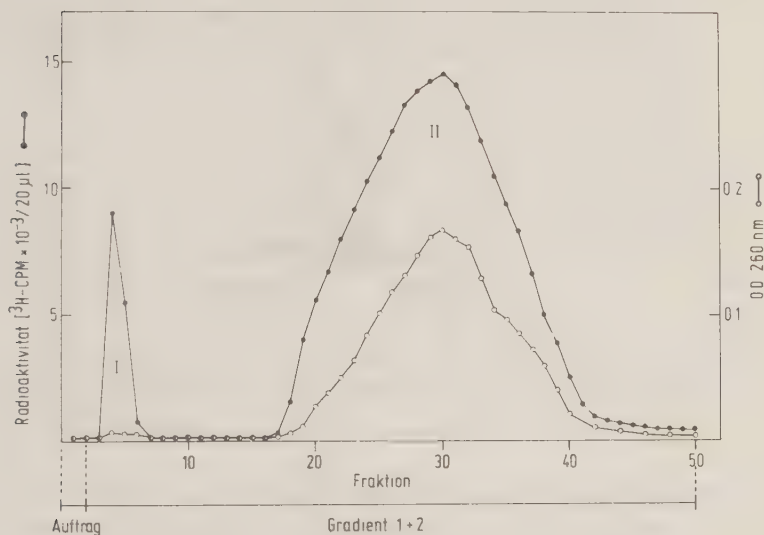


Abb. 34: Dowex 1X4-Chromatographie des in Kap. 4.7 dargestellten $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$.

Säule: 1 x 18 cm, Puffer 1 = 0.4 HCO_2NH_4 in 20 % i-Propanol pH 8.5; Puffer 2 = 2.5 M HCO_2NH_4 in 50 % i-Propanol pH 8.5. Fraktionsvolumen je ca. 7 ml. Probevolumen 0.6 ml, Durchfluß 2 ml/min.

Kurve I : D-1- ^3H -Glucose.

Kurve II : $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$.

Nach Gebrauch wurde das Harz mit 2 M Ameisensäure gespült und mit Puffer (0.4 M HCO_2NH_4 , 20 % i-Propanol pH 8.5) rückäquilibriert. Die Fraktionen Nr. 18-40 wurden vereinigt, lyophilisiert und bei -20°C aufbewahrt. Ein Aliquot der vereinigten Fraktionen wurde mit einer Dünnschichtplatte chromatographiert und mit dem Ausgangsprodukt vor dem Harz-Reinigungsschritt verglichen (Abb. 35). Die Kieselgelplatte wurde in i-Buttersäure/Wasser/konz. Ammoniak = 5 : 3 : 5, pH 9-10 entwickelt, wobei die Vorschrift von (145) verbessert wurde.

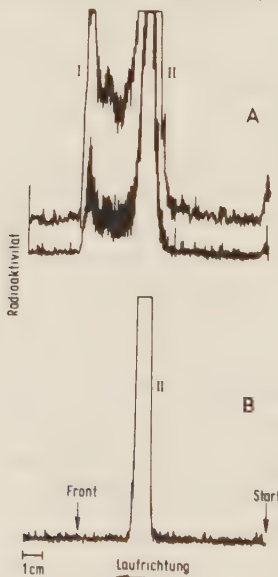


Abb. 35: Dünnschichtchromatographische Reinigung des $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$.

Kurve A : Aliquot aus Inkubation von Kap. 4.7.

Kurve B : Aliquot des in Kap. 4.8 mit Ionenaustauscher nachgereinigten $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$.

Gipfel 1 : $\text{D-1-}^3\text{H-Glucose}$.

Gipfel 2 : $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$.

Laufmittelsystem: i-Buttersäure/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ konz. = 5:3:5, pH 9-10.

4.9 Bildung tritierter Fettsäuren aus Malonyl-CoA, Acetyl-CoA, FSS und aus - aus D-1-³H-Glucose dargestelltem - B-³H-NADPH

Der Standardansatz war wie folgt zusammengesetzt:

100 µmol K-PO₄-Puffer pH 6.5, 0.2 mg Serumalbumin, 10 pmol Acetyl-CoA, 4-6 µg FSS, H₂O ad (1-X) ml. Zu dieser Reagenzienmischung wurden entweder für Eichzwecke bekannte Mengen (x ml) synthetisches Malonyl-CoA (0-50 pmol) zugegeben oder die zu messende, Malonyl-CoA enthaltende Probe (x ml), meist 10-30 pmol. Die Reaktion wurde durch Zugabe von B-³H-NADPH - nach Kap. 4.7 dargestellt - mit der reproduzierbaren Hamilton-Dosiervorrichtung aus einer 250 µl Hamiltonspritze gestartet (5 µl = 140-150 pmol B-³H-NADPH). Es wurde ca. 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 4.6 beschrieben.

4.10 Mischung aus ¹⁴C-Palmitinsäurelösung zur Extraktionsstandardisierung und aus unmarkierten Fettsäuren als Extraktionsträger

16.193 µCi 1-¹⁴C-Palmitinsäure (56 mCi/mmol) in Benzol wurde mit 250 ml einer Fettsäurenlösung, die jeweils 1.5 mM von Capron-, Oktan-, Caprin-, Laurin-, Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure enthielt, versetzt. 200 µl dieser Lösung, die 28500 DPM ¹⁴C-Palmitinsäure enthielten, wurden als Extraktionsstandard und als Extraktionsträger jeder beendeten Inkubation nach Kap. 4.9 zur quantitativen Bestimmung des Tritiumeinbaus in enzymatisch aus Malonyl-CoA, Acetyl-CoA und B-³H-NADPH gebildete Fettsäuren zugefügt (Doppelmarkierung).

4.11 Eichungen des radiochemischen Tests zur Bestimmung der Malonyl-CoA-Konzentration in Rattenleber- und Bäckerhefe-Homogenaten

Das nach (134) hergestellte Malonyl-CoA (20.0 $\mu\text{mol/ml}$) wurde mit dest. H_2O auf einen Gehalt von 1 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ verdünnt (Hamiltonspritzen). Steigende Mengen (0-60 pmol) dieser Malonyl-CoA-Eichlösung wurden mit dem nach Kap. 4.7 frisch hergestellten $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ unverdünnt und nicht weiter nachgereinigt eingesetzt. Wurde $\text{B-}^3\text{H-NADPH}$ nicht so hoher spezifischer Radioaktivität benötigt, so konnte mit unmarkiertem käuflichem 98 %igem NADPH im Verhältnis 1 : 1 und 1 : 10 verdünnt werden. Analog mußte zu den dazugehörigen Eichkurven die doppelte bzw. zehnfache Menge Malonyl-CoA und Acetyl-CoA des Standardansatzes (Kap. 4.9) eingesetzt werden.

Bei allen radiochemischen Malonyl-CoA-Bestimmungen wurden sowohl für Eichzwecke wie für die Messung der Gewebeshomogenate jeweils Tripelmessungen durchgeführt, deren Ergebnisse gemittelt wurden.

4.12 Bestimmung der Extraktionsausbeuten für geradzahlige Fettsäuren von C_6 bis C_{18}

Es wurden die Petrolätherextraktionsausbeuten für die geradzahligen Fettsäuren von C_6 bis C_{18} mit den entsprechenden radioaktiven Fettsäuren bestimmt. Von jeder Fettsäure wurden ca. 50000 DPM (Stammlösung ca. 50 mCi/mmol) und je etwa 2 μmol nicht radioaktive Fettsäure als Extraktionsträger in ein Zentrifugenglas gegeben, mit 100 μl 12 N H_2SO_4 angesäuert und mit H_2O auf 1 ml aufgefüllt. Es wurde jeweils sechsmal mit 2 ml Petroläther (Siedepunkt 40-60 $^{\circ}\text{C}$) extrahiert.

4.13 Enzymabhängigkeit der Bildung tritiierten Wassers aus B-³H-NADPH mit nativer FSS

In verschleißbare Reagenzgläser wurden pipettiert:
100 μ mol K-PO₄-Puffer pH 6.5, 0.2 mg Serumalbumin
2.0 nmol Acetyl-CoA, 300 pmol B-³H-NADPH nach Kap. 4.7
hergestellt und nach Kap. 4.8 nachgereinigt, H₂O ad 1 ml.
Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von steigenden
Mengen FSS (spez. Aktivität 2800 mE/mg) 1, 2, 3 bzw. 4 μ g.
Es wurde 15 min bei 25 ° C inkubiert und anschließend
in Aceton/Trockeneis abgekühlt. Das dabei entstandene
tritiierte Wasser wurde nach (94) lyophilisiert, das
aufgefangene Kondensat wurde mit je 10 ml Unisolve I
gemischt, nachdem vorher mit steigenden Mengen Wassers
(0 bis 1.5 ml) die Quenchkorrekturkurve für das Flüssig-
keitsszintillationsspektrometer zur Bestimmung der DPM-
Werte gemessen worden war. Wurde Acetyl-CoA durch die
entsprechende Menge MalonylCoA ersetzt oder wurden die
beiden Substanzen in der Inkubationslösung weggelassen,
erhielt man dieselbe Enzymabhängigkeit der Tritiumwasser-
bildung.

4.14 Darstellung von FMN-freier FSS

Die von Vogel angegebene Methode (98) wurde modifi-
ziert: 50 mg FSS (spez. Aktivität 2800 mE/mg), von
Ammonsulfat durch Sephadex G 50-Filtration befreit,
wurden in 1.0 M Tris-Acetat Puffer pH 8.1, 1 M LiBr ge-
löst (10 mg FSS/ml) und mit gesättigter Ammoniumhydrogen-
sulfat-Lösung, die auf pH 1.9 eingestellt war, mit mög-
lichst kleinen Tropfen (Rührspatel) im Eisbad auf pH 4.6
gebracht. Die Lösung wurde in Sorvallplastikzentrifugen-
bechern bei 20 000 g zentrifugiert (20 min) und der
Überstand abdekantiert. Der Niederschlag wurde im obigen
Puffer resuspendiert und die Titration wiederholt.

Anschließend wurde der Niederschlag im 1 M K-PO₄-Puffer pH 6.5 aufgenommen (1 mg Protein/ml) und die Enzym-Lösung vor Gebrauch durch Gelfiltration an Sephadex G 50 entsalzt.

4.15 Reaktivierung FMN freier FSS

Der Niederschlag FMN freier FSS wurde nach der letzten Titration (Kap. 4.14) im Reaktivierungspuffer bei 25 ° C gelöst (1 mg Protein/ml): 0.1 M K-PO₄-Puffer pH 7.5, 10 mM DTT, 0.5 mM K-EDTA, 10 µM FMN, 0.1 mg Rinderserumalbumin, pro ml. Die Reaktivierung war unter diesen Bedingungen innerhalb 120 min abgeschlossen. Die Aktivitätsbestimmung der so behandelten FSS erfolgte mit dem Standard-Enzymtest (Kap. 45) und ergab 2050 mE/mg (73 % der nativen FSS).

4.16 Tritiumwasserbildung aus B-³H-NADPT mit FMN-freier FSS

In verschließbaren Schliff-Zentrifugengläsern wurden vorgelegt: 150 pmol B-³H-NADPH (Kap.4.7), 19 pmol Malonyl-CoA, 10 pmol Acetyl-CoA, 15 µmol K-PO₄-Puffer pH 6.5, in 0.15 ml. Bei 25 ° C wurden je 4.5 µg Apo-FSS, dargestellt nach Kap. 4.14, zugegeben und 0,10,20,30 bzw. 35 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl 8 M Guanidin-HCl pH 8.5 und durch Abkühlen in Aceton/Trockeneis beendet. Die gesamte Inkubation wurde nach (94) lyophilisiert, und das Kondensat auf den Tritiumgehalt untersucht (Kap. 4.13). Der Rückstand wurde in 1 ml dest. H₂O gelöst, mit 200 µl 12 N H₂SO₄ angesäuert und 3 mal mit Petroläther (Siedepunkt 40 - 60 ° C) extrahiert. Der Petrolätherextrakt wurde getrocknet, mit Toluolszintillationslösung versetzt und im Scintillationsspektrometer gemessen.

4.17 Inkubation von FMN mit B-³H-NADPH

Eine 10 mM FMN-Stammlösung wurde von Herrn Dr. F. Wieland zur Verfügung gestellt. Die Schliffzentrifugengläser enthielten: 300 nmol FMN, 50 μ mol K-PO₄-Puffer pH 6.5, 1 nmol Acetyl-CoA, 1 nmol Malonyl-CoA, in 0.5 ml H₂O. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 150 pmol B-³H-NADPH (Kap. 4.7) begonnen (T = 25 ° C). Nach 0, 5, 10, 15, 20 min wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert (94). Die Anwesenheit von Malonyl-CoA und Acetyl-CoA hatte keinen Einfluß auf die Oxidation des Coenzyms FMN.

4.18 Tritiumwasserbildung bei der kompletten Fettsäuresynthetase-Reaktion

Bei 25 °C wurde eine Mischung von 150 pmol B-³H-NADPH (Kap. 4.7), 10 pmol Acetyl-CoA, 15 pmol K-PO₄-Puffer pH 6.5 mit 0,20,40 bzw. 80 pmol Malonyl-CoA, in 0.166 ml mit 1 μ g nativer FSS (spez. Aktivität 2600 mE/mg) versetzt. Nach 0,1,2,4,6,10,20,30,40,50,60,80,100 min wurde mit 200 μ l 8 M Guanidin-HCl pH 8,5 und Trockeneis/Aceton die Reaktion gestoppt und das entstandene Tritiumwasser lyophilisiert (94). Wie in Kap. 4.6 wurden die tritierten Fettsäuren aus dem Rückstand extrahiert und ihre Radioaktivität gemessen. Analog wurde mit der FSS, die der Ammoniumhydrogensulfat-Behandlung unterworfen (Kap.4.14) und mit FMN reaktiviert worden war, verfahren, nur wurde mit 4 μ g des Enzyms inkubiert.

4.19 Radiogaschromatographie

Es wurde 12 %iges, mit NPGS beladenes Chromosorb angefertigt. Die 2 m lange Trennsäule wurde analog (105) gefüllt. Ein Aliquot der zu analysierenden Probe (50 μ l) wurde in den ca. 270 ° C heißen Injektor des Gaschromato-

graphen eingespritzt. Die Fettsäurentrennung erfolgte in der sich anschließenden 2 m langen 1/8"-Säule. Es wurde ein lineares Temperaturprogramm verwendet: Beginnend bei 80 ° C wurde mit einer Heizrate von 6 ° C/min auf 230 ° C aufgeheizt und dann bei dieser Temperatur isotherm weitergearbeitet. Der Start des Temperaturprogramms erfolgte am Gipfel des C₆-Fettsäuregipfels. Heliumströmungsgeschwindigkeit: 24 ml/min, Heizstromstärke der WX-Filamente 150 mA, Temperatur des Detektorblocks 305 ° C. Bei radioaktiven Fettsäuren wurden die einzelnen Fraktionen direkt im Toluolszinter mit einem Auffangrohr aufgefangen, das bei (104) beschrieben ist. Bei allen Produktverteilungen interessierte die relative Häufigkeit der einzelnen Säuren im Ansatz, die durch die Radioaktivitätsverteilung bestimmt wurde. Etwaige Verluste einzelner tritierter Fettsäuren bei der Extraktion aus der Inkubationsflüssigkeit und bei der Aufarbeitung konnten durch Zusatz eines internen ¹⁴C-Standards der betreffenden Fettsäure korrigiert werden. Der zu untersuchende Inkubationsansatz wurde nach beendeter Fettsäuresynthese wiederum mit 50 µl 4 N KOH abgestoppt, bei 85 ° C 15 min verseift und angesäuert. Dann wurden von jeder einzelnen ¹⁴C (2n-2) Fettsäure (n = 4 - 10) je 50 000 DPM als interner Standard und außerdem eine definierte Menge nicht markierter Fettsäure zugegeben (in der Regel 2.5 µmol). Dieser Ansatz wurde dreimal mit 2 ml Petroläther (KP.: 40-60 ° C) extrahiert, der Extrakt eingedampft und mit ätherischer Diazomethan-Lösung im Überschuß versetzt. Nach ca. 10 min war bei Raumtemperatur die Veresterung vollständig abgelaufen, sodaß der Diazomethan-Überschuß abgedampft werden konnte. Die so entstandenen Fettsäuremethylester wurden zur Einspritzung in den Gaschromatographen in Toluol p.a. gelöst und zeigten folgendes Spektrum (Abb. 36):

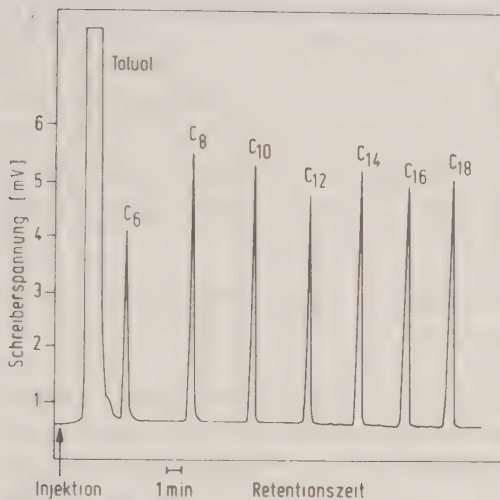


Abb. 36 Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester aus dem Standardansatz (Kap. 4.9) der Fettsäuresynthese mit zugefügten Trägerfettsäuremethylestern.

Die Methylester der

C ₆	: Capronsäure	C ₁₄	: Myristinsäure
C ₈	: Oktansäure	C ₁₆	: Palmitinsäure
C ₁₀	: Caprinsäure	C ₁₈	: Stearinsäure,
C ₁₂	: Laurinsäure		

4.20 Endproduktverschiebungen durch Variation der Acetyl-CoA-Konzentration

Ansatz im Experiment der Abb. 10,

100 μmol K-PO₄-Puffer pH 6.5, 0.2 mg Serumalbumin, 2 nmol Acetyl-CoA, 40 μg FSS, H₂O - x ad 1 ml. Steigende Mengen (x ml) Malonyl-CoA (10, 30, 60, 100, 130 und 160 pmol) wurden eingesetzt, Start mit 320 pmol B-³H-NADPH, Inkubationsdauer 30 min ($T = 25^{\circ}\text{C}$). Die Inkubationsbedingungen des Experimentes der Abb. 11 waren analog, nur wurde 30 pmol Malonyl-CoA enthaltendes Rattenleberhomogenat (Kap. 4.21) bzw. synthetisches Malonyl-CoA (30 pmol) verwendet. Bei Rattenleberhomogenaten, deren gewebeeigenes Acetyl-CoA mit Citratsynthase und Oxalacetat (Kap. 4.22) abgebaut war,

(Abb. 13) wurden die Substratkonzentrationen des Standardansatzes (Kap. 4.9) eingesetzt (10, 20, 30, 40 und 50 pmol MolCoA). Die Aufarbeitung der Proben wurde wie in Kap. 4.19 beschrieben ausgeführt. Bei dem Experiment der Abb. 15 wurde der Acetyl-CoA-Gehalt aus dem Rattenleberhomogenat entfernt (Kap. 4.22) (enthält 30 pmol Malonyl-CoA). Im parallelen Eichversuch wurde 30 pmol synthetisches Malonyl-CoA eingesetzt.

4.21 Zur Gehaltsbestimmung von Malonyl-CoA in der Rattenleber und Bäckerhefe

Die Ratten wurden durch Schlag auf den Kopf betäubt, und das Genick und die Lendenwirbelsäule mit dem Doppelmesser nach (107) durchtrennt. Die herausquellende Leber wurde herauspräpariert und mit der in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Frierstopzange (scherenartiges Instrument mit zwei Aluminiumbacken, 90 x 55 x 10 mm an den vorderen Enden) zu flachen Scheiben von 1 - 2 mm Stärke zusammengepreßt. Überstehende Teile wurden entfernt, der Rest wurde unter Zerkleinerung rasch mit einer Pinzette in ein 25 ml Becherglas gefüllt, das unter Kühlung durch flüssigen Stickstoff in einem starkwandigen Behälter aus Styropor (Fassungsvermögen maximal 10 Gläser) aufbewahrt wurde. Die gefrorenen Lebern, wie die nach Zentrifugation des Mediums eingefrorene Hefe (ca. 1.5 - 2 g), wurden in dem in flüssigem Stickstoff vorgekühlten, mit einer Stahlkugel gefüllten Teflon-Schüttelbehälter des Mikrodismembrators 20 sec lang pulverisiert. Von diesen Leber- und Hefepulvern wurden 250 mg in ein durch flüssigen Stickstoff gekühltes, vortariertes Eppendorf Reaktionsgefäß eingewogen. Die Gefäße wurden wieder kurz mit flüssigem Stickstoff gekühlt, und 0.5 ml eiskalte 6 % ige (Leber) bzw. 9 % ige (Hefe) Perchlorsäure hinein-pipettiert. Die Proben wurden sofort unter Eisbadkühlung 10 sec mit Ultraschall homogenisiert. Das Homogenat wurde 2 min unter maximaler Geschwindigkeit der Eppendorf Tischzentrifuge (ca. 10 000 g) und bei 4 ° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein zweites Gefäß pipettiert, und

der Niederschlag nochmals in 0.5 ml Perchlorsäure (Konzentrationen wie oben) 10 sec mit Ultraschall aufgewirbelt. Dann wurde wie bei der ersten Fällung zentrifugiert, und der Überstand mit dem ersten vereinigt. Unter Zugabe von möglichst kleinen Tropfen 2 N KOH auf Sarstedt Einmalspatel und unter häufigem Rühren wurde das Homogenat mit einem Tropfen Bromphenolblaulösung auf pH 4.0 bis 4.5 tritiert (für Leberhomogenat ca. 150 μ l, für Hefehomogenat 600 - 700 μ l). Anschließend wurde mit 100 μ mol K-PO₄-Puffer auf pH 6.5 neutralisiert. Die ab der ersten Perchlorsäurefällung bis zur Neutralisation verstrichene Zeit wurde als Korrekturparameter für die Gleichung in Kap. 4.28 registriert. Nach beendeter Tritation wurde der HClO₄-Niederschlag in der Eppendorf Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert und der Überstand in ein verschließbares Polypropylen-Probenröhrchen überführt und bei -20 ° C aufbewahrt.

4.22 Acetyl-CoA-Abbau der Leber- und Hefehomogenate

Zu den nach der Eiweißfällung neutralisierten Gewebeerextrakten aus Rattenlebern und Bäckerhefen wurden pipettiert: 630 nmol Oxalessigsäure (unmittelbar vor Gebrauch in dest. H₂O gelöst), 2,5 U Citratsynthase. Nach 5 min bei 30 ° C im Schüttelwasserbad wurde die Citratsynthase 3 min bei 85 ° C denaturiert. Die Proben wurden anschließend bei -20 ° C aufbewahrt.

4.23 Zersetzung von Malonyl-CoA beim Acetyl-CoA-Abbau in Gewebhomogenaten

In dem nach Perchlorsäurefällung neutralisiertem Gewebeerextrakt (12.0ml, Kap. 4.21) aus 3.0 g Rattenleber wurde der Acetyl-CoA-Spiegel (ca. 6-7 nmol/ml) nach der in

Kap. 4.27 beschriebenen Methode (146) bestimmt. Dieses Rattenleberhomogenat wurde in drei gleiche Teile geteilt und in drei parallelen Versuchsreihen mit je 2.5, 5.0 bzw. 7.5 μM synthetischem Malonyl-CoA versetzt. Im Anschluß daran wurde der in Kap. 4.22 angegebene Acetyl-CoA-Abbau durchgeführt, wobei die Inkubation von Oxalessigsäure und Citratsynthase durch drei minütiges Erhitzen nach 0, 5, 10 und 15 min gestoppt und anschließend der Malonyl-CoA-Spiegel zu diesen Zeiten mit der radiochemischen Methode (Kap. 4.9) gemessen wurde. Von der ursprünglichen Acetyl-CoA-Konzentration war schon nach 5 min mit der erwähnten Methode nicht mehr nachzuweisen.

4.24 Perchlorsäureextraktionsoptimum und Wiederfindungsraten von Rattenleber- und Hefehomogenaten

Es wurden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11- und 12 % ige Perchlorsäurelösungen hergestellt. Jeweils 250 mg der Rattenleber- und Bäckerhefe-Pulver wurden wie in Kap. 4.21 zweimal mit den betreffenden Perchlorsäurekonzentrationen von Protein befreit. Zuvor wurden in einem Parallelversuch gleichen Mengen pulverisierter Probe jeweils 5 μM synthetisches Malonyl-CoA zugegeben. Um die Vollständigkeit der Extraktion zu überprüfen, wurde nochmals zweimal mit Perchlorsäure extrahiert, die beiden Extraktionen getrennt neutralisiert und der Malonyl-CoA-Spiegel gemessen (Kap. 4.29). Der Vergleich zu dem Parallelversuch mit zugefügtem synthetischem Malonyl-CoA ergab die Wiederfindungsrate.

4.25 Stabilität von Malonyl-CoA in verdünnter Perchlorsäure

Je 1.5 nmol einer Malonyl-CoA-Lösung in 0.25 ml H₂O wurden mit 1 ml eiskalter 6 %iger Perchlorsäure versetzt und nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min unter Eiskühlung vorsichtig mit 2 N KOH neutralisiert (Kap. 4.21). Das ausgefallene KClO₄ wurde abzentrifugiert und der Malonyl-CoA-Spiegel nach dem Standardansatz in Kap. 4.9 bestimmt.

4.26 Messung des NADPH-Gehalts im neutralisierten Gewebeerextrakt (147)

In einer Küvette (d = 1 cm) wurden vorgelegt:
87.7 mM 0.1 M Tris-HCl-Puffer pH 8.0, 0.94 mM Na-EDTA, 4.6 mM GSSG, 0.16 mM NADPH, 1 ml neutralisierter Rattenleberextrakt einer normal gefütterten Ratte oder einer Eich-NADPH-Lösung, Testvolumen 2.85 ml, T = 25 ° C, 334 nm Hg Meßstrahlung. Nach Verfolgung des Blindlaufes wurde mit 0.02 ml Glutathion-Reduktase gestartet.

4.27 Radiochemische Acetyl-CoA-Bestimmung (146)

a) Herstellung von ¹⁴C-Oxalacetat:

In einem Eppendorf Reaktionsgefäß wurden pipettiert:
0.02 ml 1 M Tris-HCl-Puffer pH 7.2, 0.2 ml 0.2 M α-Ketoglutarat, 0.08 ml DL-4-¹⁴C Aspartat (0.5 mCi/- 2.8 mg) und 0.02 ml Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, die vorher bei 10 000 g 3 min (Eppendorf Tischzentrifuge) von Ammonsulfat befreit und anschließend in H₂O resuspendiert worden war. Die Inkubation dauerte 20 min bei 25 ° C. 0.2 ml des Ansatzes wurden anschließend auf eine Pasteurpipettensäule (0.5 x 5 cm) gefüllt mit BioRad AG

50 WX8, 200 - 400 mesh (H^+ -Form), aufgetragen. Nachdem diese 0.2 ml durchgelaufen waren, wurde mit 1,1 ml dest. H_2O gespült, das ^{14}C -Oxalacetat enthaltende Eluat in eisgekühlten Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen und mit 0.175 ml 0.5 N NaOH und mit 0.1 ml 1 M Tris-HCl-Puffer pH 7.0 neutralisiert.

b) Acetyl-CoA-Bestimmung

Das ^{14}C -Oxalacetat wird mit dem zu messenden Acetyl-CoA und der Citratsynthase zu Citrat umgesetzt, und die Fixierung von Radioaktivität in Citrat gemessen. Die untere Nachweisempfindlichkeit der Methode lag bei 20 pmol/Bestimmung. In ein Packard-Plastikszintillationsgefäß wurden pipettiert: 0.1 ml 1 M Tris-HCl Puffer pH 7.2, 0.4 ml H_2O , 0.1 ml Probe, 0.025 ml L-4- ^{14}C -Oxalacetat (nach Kap. 4.27, a, ca. 1.3 nmol), 0.02 ml Citratsynthase, von Ammonsulfat befreit. Es wurde 30 min bei 30 ° C im Schüttelwasserbad inkubiert, und die Reaktion mit 0.02 ml einer 1 : 1 Mischung von 1 M Citronensäure und 12 %iger $HClO_4$ gestoppt. Anschließend wurde 50 min bei 120 ° C der ^{14}C -Oxalacetat-Überschuß decarboxyliert (Abzug). Die Proben wurden nach Versetzen mit 10 ml Szintillationslösung [5.5 g Permablend III '91 % PPO, 9 % Bis-MSB), 100 ml absolutes Äthanol, 20 g Äthylen-glykol, 50 g Naphtalin in 1 l Dioxan p.a.] versetzt und ca. 3 h auf einer Schüttelmaschine geschüttelt, bis die Zählaluben im Szintillationsspektrometer konstant blieben.

4.29 Berechnung der Malonyl-CoA-Konzentration in Rattenleber- und Hefehomogenaten

Beim radiochemischen Malonyl-CoA-Test wurden die entstandenen tritiierten Fettsäuren in Toluolscinter gelöst und im Szintillationsspektrometer gemessen, das gleichzeitig die zur Korrektur der Extraktionsausbeuten zugefügten definierten Mengen ^{14}C -Palmitinsäure erfassen kann (Doppelmarkierung). Da sich die beiden Zählfenster des Spektrometers überschneiden, ist die Eichung mit bekannten Mengen ^3H -Hexadecan und ^{14}C -Hexadecan notwendig. In Gleichung 7 ist die Formel angegeben, die unter Berücksichtigung dieser Eichungen die wahren Tritiumzerfälle der markierten Fettsäuren, auf 100 % Extraktionsausbeute korrigiert, angibt:

$$(7) \quad \left(\frac{A - \frac{B}{C} \times D}{E} - \frac{F - \frac{H}{C} \times D}{E} \right) \times \frac{G \times C}{B} = \text{DPM } ^3\text{H-Fettsäuren auf 100 \% Extraktionsausbeute korrigiert.}$$

A = CPM ^3H vom Szintillationsspektrometer gemessen (Tritiumkanal).

B = CPM ^{14}C vom Szintillationsspektrometer gemessen (Kohlenstoffkanal).

C = 0.6948 = Zählausbeute ^{14}C im Kohlenstoffkanal (%/100).

D = 0.0929 = Zählausbeute ^{14}C im Kohlenstoffkanal (%/100).

E = 0.3947 = Zählausbeute ^3H im Tritiumkanal (%/100).

F = ^3H -CPM Mittelwert im Petrolätherextrakt von Standardinkubationen Kap. 4.9 jedoch ohne Malonyl-CoA (Tritiumkanal).

G = 28 700 = ^{14}C -DPM der vor der Petrolätherextraktion zugesetzten 1 - ^{14}C -Palmitinsäure.

H = ^{14}C -CPM Mittelwert im Petrolätherextrakt von Standardinkubationen Kap. 4.9, jedoch ohne Malonyl-CoA (Kohlenstoffkanal).

Die aus Gleichung 7 erhaltenen ^3H -DPM-Fettsäuren, korrigiert auf 100 % Extraktionsausbeute, wurden in Gleichung 8 eingesetzt, die alle zu messenden Korrekturparameter enthält. Das Ergebnis wird in pmol Malonyl-CoA/g Leber oder Hefe (Feuchtgewicht) erhalten.

$$(8) \frac{(Z \times Y + W + V + U + T + S) \times R \times 100}{Q \times P \times Z \times (100 - N \times M)} = \text{pmol Malonyl-CoA/g Leber oder Hefe feucht.}$$

Z = 0.25 = Leber-, Hefepulver (g).

Y = 0.75 = Flüssigkeitsgehalt der Leber (%/100).

W = 1.0 = Volumen 6 % bzw. 9 % Perchlorsäure (ml).

V = 0.15 = Volumen 2 N KOH (ml).

U = 0.1 = Volumen 1 M K-PO_4 -Puffer pH 6.5 (ml).

T = 0.063 = Volumen Oxalacetatlösung (ml).

S = 0.02 = Volumen Citratsynthase (ml).

R = ^3H -DPM-Fettsäuren auf 100 % Extraktionsausbeute korrigiert, aus Gleichung 7.

Q = 8000 = Steigung Eichkurve = $\frac{\text{DPM } ^3\text{H Petrolätherextrakt}}{\text{pmol Malonyl-CoA eingesetzt}}$

P = ml Probe im Test eingesetzt.

N = Neutralisationsdauer (min).

M = 0.175 = Steigung HClO_4 -Zersetzung von = $\frac{\% \text{ Zersetzung}}{\text{Zeit (min)}}$

4.29 Zu Kap. 2.7 (Der Malonyl-CoA-Gehalt der Rattenleber unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen)

4.29.1 Bestimmung der Glucose und von Alkohol im Blut

Bei den diabetischen Tieren (Kap. 4.29.4) wurde der Blutzucker, bei den Tieren des Alkohol- und Fettexperimentes (Kap. 4.29.9) wurde der Blutalkoholspiegel gemessen. Dazu wurden 0.2 ml Blut einer geschlachteten Ratte in ein Eppendorfreaktionsgefäß, das 1 ml eiskalter 4 %iger HClO_4 -Lösung enthielt, pipettiert, geschüttelt und 1 min bei ca. 10 000 g der Eppendorftischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde mit KOH neutralisiert; der KClO_4 -Niederschlag wurde abzentrifugiert, und die Probe mit Eis gekühlt.

Zur Blutzuckerbestimmung wurden in der Küvette gemischt: 0.95 ml einer Lösung von $8.5 \mu\text{mol NADP}^+$ und $10 \mu\text{mol ATP}$ in 10 ml 0.2 M Triäthanolaminpuffer pH 7.5 (5 mM an MgCl_2) und 0.05 ml des neutralisierten Blutextraktes. Nach Registrierung des Blindlaufes wurden 0.01 ml einer Enzymmischung aus Hexokinase und Gl-6-P-Dehydrogenase zugegeben.

Für den Test auf Blutalkohol wurde die Boehringer-Testkombination verwendet, welche die Umsetzung des Äthanol mit ADH und Aldehyddehydrogenase zu Acetat vollzieht (148). Es wurden 0.1 ml der 1:100 verdünnten, mit Perchlorsäure enteiweißten und neutralisierten Blutprobe eingesetzt.

4.29.2 Tag- und Nachtrhythmus der Ratten

Für die Bestimmung des Malonyl-CoA-Gehalts der Leber in Abhängigkeit vom Lebensrhythmus der Ratten wurden an einem Tag um 8, 11, 14, 17, 20, 23, 2, 5 Uhr MEZ je sechs

Ratten geschlachtet, und ihre Lebern gleich im Anschluß an die Schlachtung aufgearbeitet. Die neutralisierten Leberextrakte wurden nach Pufferzusatz bei -20°C aufbewahrt und nach der letzten Schlachtung gemeinsam weiterverarbeitet.

4.29.3 Gehungerte Ratten

Für die Untersuchung der Malonyl-CoA-Konzentration in den Lebern gehungerter Ratten wurde 16 Tieren 24 h und 48 h vor der Schlachtung das Futter entzogen, während die Kontrolltiere normal weitergefüttert wurden. Eine weitere Kontrollgruppe bestand aus acht Tieren, die 48 h gehungert und anschließend drei Tage mit Normalfutter gefüttert wurden. Alle Versuchstiergruppen wurden um 9 Uhr MEZ geschlachtet.

4.29.4 Alloxandiabetische Ratten

Vierzig 300 - 350 g schweren Ratten wurde 24 h das Futter entzogen. Um 10 Uhr MEZ wurden (Alloxan-Monohydrat frisch in physiologischer Kochsalzlösung gelöst) den Ratten pro kg Körpergewicht in eine Schwanzvene gespritzt. Zu diesem Zweck wurden die Ratten mit Äther narkotisiert. Kurz nach der Alloxanspritzung wurden die Nieren in Höhe der Lendenwirbelsäule ca. 5 sec mit den Fingern abgedrückt, um einem akuten Nierenschock vorzubeugen. Sechs Kontrollratten wurden mit physiologischer Kochsalzlösung statt mit Alloxan gespritzt. Anschließend wurden die Tiere mit Altrominfutter und Wasser ad libitum versorgt. 24 h nach der Alloxangabe erhielten die alloxanisierten Ratten die ersten 3 I.E. Depotinsulin (Rind, 400 I.E./10 ml) subkutan. Die Substitution mit jeweils 3 I.E. Depotinsulin wurde morgens und abend eine Woche lang

durchgeführt. Den Kontrollratten wurde statt Insulin physiologische Kochsalzlösung gespritzt. Bei elf diabetischen Tieren wurde 24 h vor der Schlachtung die Insulinsubstitution abgebrochen, wobei diese Ratten einen akuten Diabetes mellitus entwickelten, der sich deutlich in der Hyperglykämie des Urins und des Blutes und in einer starken Abnahme des Körpergewichtes äußerte (Abb. 37).

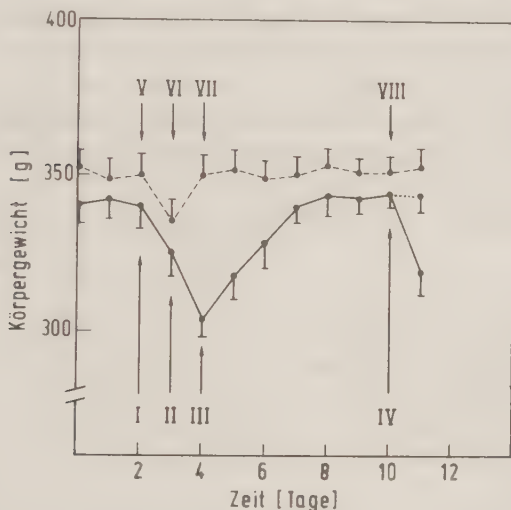


Abb. 37: Körpergewichtsdiagramme von Ratten im Diabetesversuch (Mittelwert von 4 Ratten).
 Durchgezogene Linie: alloxanisierte Tiere.
 I : Futterentzug.
 II : Alloxangabe, Futter ad libitum.
 III : Depotinsulingabe.
 IV : Abbruch der Insulinsubstitution.
 Ausgezogene Linie: scheinbehandelte Tiere.
 V : Futterentzug.
 VI : Physiologische Kochsalzlsg., Futter ad lib.
 VII : "
 VIII : "
 gepunktete Linie : zwei alloxanisierte Tiere mit durchgehender Insulinsubstitution.

4.29.5 Zusammensetzung und Herstellung der Diäten

Nähere Angaben über Altromin finden sich bei Brock et al. (149). Tab. 2 gibt eine Übersicht der Zusammensetzungen der verwendeten semisynthetischen Diäten (Angaben in Gewichts-%). Die pulverförmigen Bestandteile wurden durch Schütteln in einem Behälter gründlich vermischt, mit Wasser angeteigt, an der Luft getrocknet und in ca. 10 g schwere Stücke zerkleinert. Diät A war das Altrominfutter C 1000, Diät B entsprach dem Altrominfutter C 1010.

Tabelle 2: Zusammensetzung einiger semisynthetischer Diäten (Zahlenangaben in Gew. %).

Ingredienz	Volldiät	Kohlenhydrat- diät		Fettdiät		Proteindiät
	A	B	C	D	E	E
Casein	22	18		23		
Stärke DAB 6	53	34				
Saccharose	10	33				
Sojaöl raff.	3	3				
Cellulose- pulver	4	4				
Minerale u. Spurenelem.	6	6		5		
Vitaminvor- mischung	2	2		2		
Zwieback			100			
Palmitin- säure				70		
Rinderspeck gestocktes					100	
Eiweiß						100

4.29.6 Vitaminmischung: (Zusätze in 1000 g Diät)

Vitamin A 15 000 IE., Vitamin D₃ 500 IE, Vitamin E 150 mg,
Vitamin K₃ 10 mg, Vitamin B₁ 20 mg, Vitamin B₂ 20 mg,
Vitamin B₆ 15 mg, Vitamin B₁₂ 30 mg, Nikotinsäure 50 mg,
Pantothersäure 50 mg, Folsäure 10 mg, Biotin 200 mg,
Cholin 1000 mg, p-Aminobenzoessäure 100 mg, Inosit 100 mg,
Vitamin C 20 mg, DL-Methionin 3500 mg.

4.29.7 Salzmischung: (Zusätze in 1000 g Diät)

CaCO₃ 14 g, CaHPO₄ 14 g, K₂HPO₄ (sicc.) 10 g, NaCl 8 g,
a₂HPO₄ (sicc.) 7 g, MgSO₄ · 7H₂O 5 g, Fe(II)-Gluconat ·
2H₂O 148 mg, MnSO₄ · 4H₂O 450 mg, ZnCO₃ 40 mg, CuSO₄ ·
5 H₂O 20 mg, KI 0.5 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.5 mg, NaF 10 mg.

4.29.8 Fütterung

Die Ratten (150 - 200 g) wurden, nachdem sie ca. eine Woche an die Käfigbedingungen gewöhnt worden waren, 48 h lang gehungert. Um 9 Uhr wurde dann mit der Fütterung ad libitum der Diäten A,B,C,D,E,F (Kap. 4.29.5) begonnen. Das Futter wurde in keinem Fall von den Tieren verweigert; nach Schlachtung der Tiere wurde jedesmal ein gut bis prall gefüllter Magen beobachtet. Nach 2,4, 8,12,24,32,48,72,96,168 h wurden die Tiere getötet, und die Lebern zur Aufarbeitung entnommen (Kap. 4.21). Jeweils zwischen 8-9 Uhr MEZ wurde das Gewicht der Tiere gemessen, da dadurch eine empfindliche Kontrolle ihres Gesundheitszustandes erzielt wird (Abb. 38).

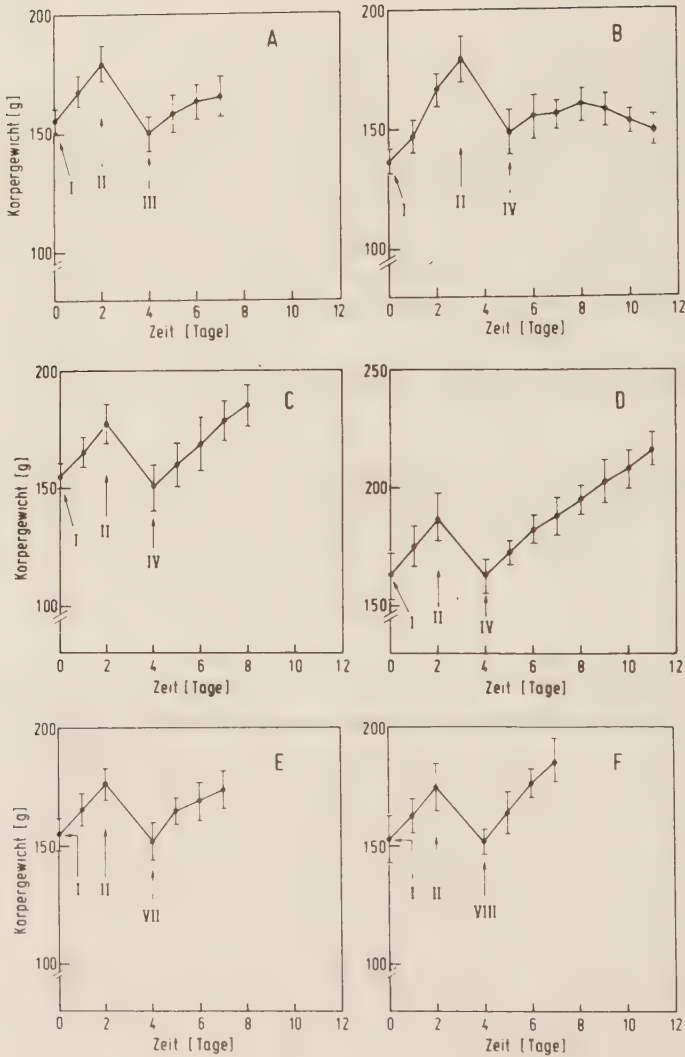


Abb. 38: Körpergewichtsdiagramme von Ratten, die nach 48 h Hunger mit

A Speck	(s. Kap. 4.29.5)
B Palmitinsäure	(s. Kap. 4.29.5)
C Zwieback	(s. Kap. 4.29.5)
D Stärke/Saccharose	(s. Kap. 4.29.5)
E Eiweiß	(s. Kap. 4.29.5)
F Haltungsfutter	(s. Kap. 4.29.5)

Mittelwert von je vier Tieren. Legende s. S. 91.

Legende zu Abb. 38:

Zeitpunkte

- I Fütterung mit Haltungsfutter .
- II Beginn Hunger .
- III Wiederfütterung mit Speck .
- IV Wiederfütterung mit Palmitinsäure .
- V Wiederfütterung mit Zwieback .
- VI Wiederfütterung mit Stärke/Saccharose .
- VII Wiederfütterung mit gestocktem Hühnereiweiß .
- VIII Wiederfütterung mit Haltungsfutter .

4.29.9 Alkohol- und Fettfütterung (zu Kap. 2.7.6)

Zur Gewöhnung der Ratten an Alkohol im Trinkwasser wurde die von Falk et al. (124) übernommene Methode wie folgt geändert: ca. 300 g schwere Ratten wurden mit Haltungsfutter und Wasser ad libitum versorgt und fünf Tage an die Käfigbedingungen gewöhnt. Anschließend wurde ihnen zwei Tage das Futter entzogen. Als sie mit normalem Futter, morgens und abends je 5 - 6 g, wiedergefüttert wurden, erhielten sie gleichzeitig zum Trinkwasser 1 % Alkohol zuge-mischt. Fünf Tage lang erhielten sie täglich dieselbe Menge Futter; Trinkwasser mit 1 % Alkohol stand ihnen ad lib zur Verfügung. Nach Ablauf des 5. Wiederfütterungstages wurden sie wieder 48 h gehungert. Bei der Wiederfütterung wurde wie zuerst verfahren, nur erhielten die Tiere 3 %igen Alkohol ad lib. Nach wiederum fünf Tagen hungerten die Tiere ein drittes Mal 48 h und erhielten bei Wiederfütterung 5 %igen Alkohol unter sonst gleichen Futterbedingungen. Innerhalb von drei Tagen gewöhnten sich die Tiere an die neuen Lebensbedingungen, sodaß dann mit dem Versuch begonnen werden konnte: Nach 48 Stunden Hunger erhielten die Ratten Speck und 5 %igen Alkohol ad lib. Dann wurden sie nach 2,4,8,12,24,32,48 und 72 h geschlach-tet und der Malonyl-CoA-Spiegel der Leber gemessen (Kap.4.21).

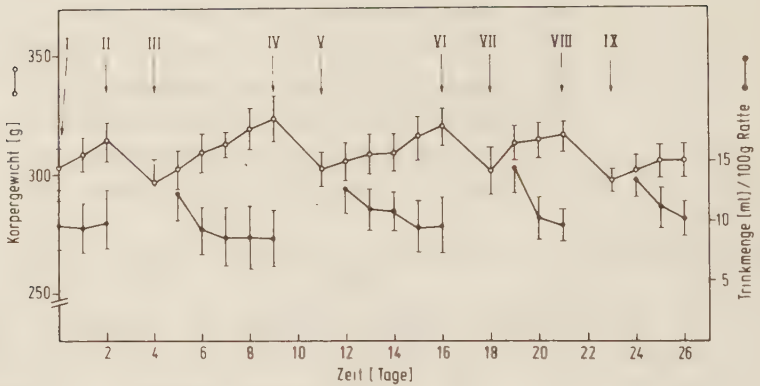


Abb. 39: Körpergewichtsdiagramme von Ratten, die zunächst an 5 %igen Alkohol im Trinkwasser gewöhnt und anschließend mit Speck gefüttert wurden. (Mittelwert von vier Tieren).

Zeitpunkte:

- I Fütterung mit Haltungsfutter und H_2O ad lib.
- II Hunger.
- III 5-6 g Haltungsfutter jeweils morgens u. abends, 1 % Alkohol ad lib.
- IV Hunger.
- V 5-6 g Haltungsfutter jeweils morgens u. abends, 3 % Alkohol ad lib.
- VI Hunger.
- VII 5-6 g Haltungsfutter jeweils morgens u. abends, 5 % Alkohol ad lib.
- VIII Hunger.
- IX Speck und 5 % Alkohol ad lib.

30 Der Malonyl-CoA-Gehalt der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) unter verschiedenen Stoffwechselbedingungen (zu Kap. 2.8)

0.1 Substratverarmung

Ca. 120 g Bäckerhefe wurden in 950 ml Leitungswasser aufgeschlemmt und anschließend 12 min im GSA-Rotor bei 8000 UPM und 20 ° C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde nochmals in 800 ml Leitungswasser suspendiert und abermals zentrifugiert. In drei Fernbachkolben mit je 200 ml Leitungswasser wurden jeweils 40 g Hefeniederschlag eingewogen, mit Wattestopfen versehen und 16 - 20 h bei 30 ° C und 150 UPM auf der Schüttelmaschine bewegt. Anschließend wurde wie im folgenden Kap. 4.30.2 eine Aliquot der Hefesuspension entnommen und nach weiterer Aufarbeitung (Kap. 4.21) der Malonyl-CoA-Spiegel gemessen.

0.2 Glucose

Die nach Kap. 4.30.1 verarmte Hefe wurde 12 min im GSA-Rotor bei 8000 UPM und 20 ° C zentrifugiert. 40 g Hefeniederschlag wurden zu 200 ml M/15 K-PO₄-Puffer pH 6.5 in einen sterilen Fernbachkolben gegeben. Nachdem sich durch Schütteln die Hefe gleichmäßig verteilt hatte, wurden entweder 1 %, 10 %, oder 20 % D-Glucose zugegeben. Nach 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 und 3.5 h wurden je 7 ml Hefesuspension entnommen, bei 0 ° C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, und der Niederschlag in flüssigem Stickstoff, der Überstand bei -20 ° C aufbewahrt. Der Hefeniederschlag (ca. 1.2 - 1.4 g) wurde pulverisiert (Kap. 4.21), 250 mg des Pulvers von Eiweiß (Kap. 4.21) und von Acetyl-CoA (Kap. 4.22) befreit und anschließend der Malonyl-CoA-Spiegel untersucht. (Kap. 4.9). Die Glucose des Mediumüberstandes wurde nach Kap. 4.29.1 gemessen. In einem

Parallelansatz wurde die Hefe ohne Glucose analog behandelt und der Malonyl-CoA-Spiegel registriert. Statt des $K-PO_4$ -Mediums wurde auch ein Medium verwendet, das aus 2 % Bactopecton und 1 % Hefeextrakt bestand.

4.30.3 Alkohol und Acetat

Zu 40 g verarmter Hefe (Kap. 4.30.1) wurden zu 200 ml M/15 $K-PO_4$ -Puffermedium 0,6 bzw. 1,2 % Alkohol, oder 3 % bzw. 6 % Na-Acetat oder eine Mischung aus 1,2 % Alkohol und 6 % Na-Acetat zugesetzt. Nach 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360 min wurde ein Aliquot der Hefesuspension entnommen (Kap. 4.30.2) und der Malonyl-CoA-Spiegel nach weiterer Aufarbeitung des Niederschlags (Kap. 4.21) gemessen. Der Acetat-Gehalt im Medium-Überstand wurde mit dem gekoppelten Test, der sich die Umsetzung von Acetat mit CoA und ATP zu Acetyl-CoA in Gegenwart des Enzyms Acetyl-CoA-Synthetase und den anschließenden Umbau des entstandenen Acetyl-CoA mit Oxalacetat mittels Citratsynthase in Citrat zunutze macht, bestimmt (148). Äthanol im Mediumüberstand wurde wie in Kap. 4.29.1 (148) gemessen.

4.30.4 Oktan-, Laurin-, Palmitin-, Stearin-, Linol- und Linolensäure (zu Kap. 2.8.4)

Um die Aufnahme von radioaktiv markierten Fettsäuren durch Hefen aus dem Medium zu verfolgen, wurde unter Änderungen das von (150) beschriebene Verfahren angewendet:

Ca. 1,5 ml der Hefesuspension aus verarmter Hefe (Kap. 4.30.1) und 200 ml M/15 $K-PO_4$ -Puffermedium pH 6,5, mit Zusätzen von 1 mM Fettsäuren und 2 % Brij 58, wurden bei 0 ° C mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge (10 000 g) zentrifugiert. Zum Niederschlag wurden 1,2 ml 85 ° C heiße

Lösung aus Tween 40 (1 % w/v) und 1 μ M der betreffenden Fettsäure zugegeben, geschüttelt, 1 min in das Wasserbad gestellt (85 ° C) und anschließend zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde 5 ml wiederholt, die Überstände vereinigt, ein Aliquot (1 ml) entnommen, mit Unisolve (10 ml) versetzt, und die Radioaktivität im Szintillationsspektrometer gemessen. In Vorversuchen wurde auf die Waschprozedur verzichtet, und der Überstand nach der ersten Zentrifugation der Hefesuspension direkt mit Unisolve versetzt.

4.30.5 Hitzeinaktivierung der Hefe (zu Kap. 2.8.4)

60 g der verarmten Hefe (Kap. 4.30.1) wurden in einem Fernbachkolben mit 200 ml isotoner Kochsalzlösung eingewogen. Der Kolben wurde 35 min bei 85 ° C geschüttelt, auf 0 ° C abgekühlt, und der Inhalt zentrifugiert. 40 g des Hefeniederschlages, der nach mikroskopischer Prüfung aus intakten Zellen bestand, wurden in 200 ml M/15 K-PO₄-Puffer pH 6.5 gelöst, der 10 mM Palmitinsäure, 1 μ Ci U-¹⁴C-Palmitinsäure (55 mCi/mmol) und 2 % Brij 58 enthielt. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 min Schütteln (150 UPM) wurde ein Aliquot (7 ml) entnommen und die Radioaktivität im Überstand gemessen (Kap. 4.30.4).

4.30.6 Inkubation verarmter Hefe mit Fettsäuren und Glucose (zu Kap. 2.8.5)

In sterilen Fernbachkolben befanden sich: 200 ml steriler K-PO₄-Puffer pH 6.5, 2 % Brij 58, 40 g verarmte Hefe (Kap. 4.30.1). Die Inkubation wurde bei 30 ° C, 150 UPM und aeroben Bedingungen gestartet mit:

a) je 10 mM Fettsäuren: Palmitin-, Stearin-, Linolen-,

Linol-, Laurin- und Oktansäure. Bei den Einbaustudien (Kap. 2.8.4) waren noch je 17 000 CPM U-¹⁴C-Palmitinsäure (240 mCi/mmol), bzw. 18 500 CPM 1-¹⁴C-Stearinsäure (61 mCi/mmol), bzw. 18 700 CPM 1-¹⁴C-Linolensäure (53 mCi/mmol), bzw. 18 700 CPM Linolsäure (58 mCi/mmol), bzw. 19 500 CPM 1-¹⁴C-Laurinsäure (23 mCi/mmol), bzw. 19 000 CPM 1-¹⁴C-Oktansäure (15 mCi/mmol) zugegeben. Bei Langzeitinkorporationsstudien von Stearin-, bzw. Palmitinsäure durch verarmte Hefe wurden alle 24 h erneut 10 mM Fettsäuren dem Medium zugefügt. In einem Kontrollversuch, unter Weglassung von Brij 58, wurden keine veränderten Aufnahmegeschwindigkeiten von Substraten durch Hefe festgestellt.

b) D-Glucose, 1 %, bzw. 10 %, bzw. 20 %.

c) je 10 mM Palmitin-, Stearin-, Linol und Linolensäure. Nach 45, 180, 660 min, 16 h, 72 h und 120 h Vorinkubation mit Palmitin-, bzw. Stearinsäure wurden jeweils 10 % D-Glucose zugegeben. Mit Linol-, bzw. Linolensäure wurde 28 h vor der Glucosegabe vorinkubiert.

Anschließend wurden Aliquote zu je 7 ml entnommen (Kap. 4.30.2) und der Hefeniederschlag auf den Malonyl-CoA-Gehalt untersucht (Kap. 4.21). Zum Vergleich wurde jedesmal parallel, unter denselben Bedingungen eine Inkubation ohne Glucose-, bzw. ohne Fettsäurezusatz durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Mit Hilfe radiochemischer Methoden, deren Grundlage eine spezifische enzymatische Umwandlung war, wurde ein neues empfindliches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Malonyl-CoA-Gehaltes in Rattenlebern und Hefezellen entwickelt.

Malonyl-CoA aus entweißten, vom endogenen Acetyl-CoA-Gehalt befreiten Leber- und Hefeextrakten, wird mit B-³H-NADPH, definierten Acetyl-CoA-Mengen und Fettsäuresynthetase aus Hefe zur Synthese von radioaktiv markierten Fettsäuren verwendet. Die entstandenen tritierten Fettsäuren werden aus der Inkubation mit Petroläther extrahiert, und der Tritiumgehalt mit einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer bestimmt. Zur Korrektur der Extraktionsausbeute wird ¹⁴C-Palmitinsäure als interner Standard verwendet.

Mit diesem Verfahren, das gegenüber optischen Methoden um den Faktor 1000 empfindlicher ist, konnte untersucht werden, wie die Stationärkonzentration des Malonyl-CoA in der durch Frierstop fixierten Rattenleber und der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) von Stoffwechselbedingungen beeinflusst wird, die mit einer Veränderung der Lipogenese einhergehen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß die Stationärkonzentration von Malonyl-CoA, die im Normalzustand bei 180 - 220 g schweren Ratten durchschnittlich 6 - 7 nmol/g feuchte Leber beträgt, erheblichen regulatorischen Einflüssen unterliegt:

- 1) Der Malonyl-CoA-Gehalt der Rattenleber unterliegt tageszeitlichen Schwankungen.
- 2) Im Hunger erniedrigt sich die Malonyl-CoA-Konzentration auf weniger als ein Zehntel des bei normal gefütterten Ratten gefundenen Wertes.
- 3) Alloxandiabetische Ratten zeigen einen 0.25 fach erniedrigten Malonyl-CoA-Spiegel, der bei insulinsubstituierten Ratten fast auf das Doppelte des von scheinbehandelten Tieren erhaltenen Wertes ansteigt.
- 4) Gehungerte Ratten, ebenso wie gehungerte und gleichzeitig alkoholisierte Ratten zeigen, nachdem sie mit fettreicher Diät wiedergefüttert wurden, einen gegenüber den mit Normalfutter gefütterten Tieren stark gesenkten Malonyl-CoA-Spiegel der Leber.
- 5) In Lebern gehungerter Ratten, die mit kohlenhydratreicher Diät wiedergefüttert waren, steigt der Malonyl-CoA-Gehalt wesentlich schneller an und übersteigt den bei normal gefütterten Tieren gefundenen Wert.

Aus der Korrelation dieser Befunde mit der Acetyl-CoA-Carboxylase-Aktivität wird gefolgert, daß Änderungen des Malonyl-CoA-Spiegels der Rattenleber in erster Linie mit Schwankungen der Syntheserate und nicht mit der Verbrauchsrate dieses Stoffwechselprodukts verknüpft sind.

Mit dem neu entwickelten radiochemischen Test wurde auch die Malonyl-CoA-Konzentration der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bei verschiedenen Stoffwechselanforderungen untersucht:

6) Werden die Hefen unter Stationärphasenbedingungen ohne Substrate inkubiert (Verarmung), sinkt die Malonyl-CoA-Konzentration auf 50 pmol/g feuchte Hefe ab.

7) Wird diese verarmte Hefe mit D-Glucose inkubiert, nimmt der Malonyl-CoA-Gehalt um das 30 bis 60 fache zu und sinkt parallel zum Verbrauch der D-Glucose im Medium.

8) Die verarmte Bäckerhefe nimmt radioaktiv markierte Fettsäuren in folgender Reihenfolge aus dem Medium auf: Palmitin-, > Stearin-, > Linolen-, > Linol-, > Laurin-, > Oktansäure.

9) Nach Vorinkubation verarmter Hefe mit Palmitin-, Stearin-, Linol- und Linolensäure und anschließender Gabe von D-Glucose steigt der Malonyl-CoA-Gehalt bis zum 7 fachen des Wertes, der von Hefen, die ohne Fettsäuren vorinkubiert werden, erhalten wird.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Lynen, F., Fed. Proc. 20: 941 - 951 (1961)
- 2) Lynen, F., Hopperkessen, I., Eggerer, H., Biochem. Z. 340, 95 - 124 (1964)
- 3) Bressler, R., Wakil, S.J., J. Biol. Chem. 237, 1441 - 1448 (1962)
- 4) Brooks, J.L., Stumpf, P.K., Arch. Biochem. Biophys. 116, 108 - 116 (1966)
- 5) Lynen, F., Sitzungsbericht d. Bayer. Akad. d. Wiss., Math.-Nat. Klasse S. 8 - 10 (1960)
- 6) Lynen, F., Biochem. J. 102, 381 - 400 (1967)
- 7) Holtermüller, K.H., Ringelmann, E., Lynen, F., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 1411 - 1422 (1970)
- 8) Elovson, J., J. Bact. 124, 524 - 533 (1975)
- 9) Hsu, R.-Y., Wasson, G., Porter, J.W., J.Biol.Chem. 240, 3736 - 3746 (1965)
- 10) Burton, D.N., Haavik, A.G., Porter, J.W., Arch. Biochem. Biophys. 126, 141 - 154 (1968)
- 11) Wilson, A.C., Williamson, I.P., Biochem. J. 117, 26P - 27P (1970)
- 12) Carey, E.M., Dils, R., Biochem. Biophys. Acta 210, 371 - 378 (1970)
- 13) Roncari, D.A.K., Can. J. Biochem. 52, 221 - 230 (1974)
- 14) Prescott, D.J., Vagelos, P.R., Adv. Enzymol. 36, 269 - 311 (1972)
- 15) Stumpf, P.K., Ann. Rev. Biochem. 38, 159 - 212 (1969)
- 16) Lynen, F., J. Cell. Comp. Physiol. 54, Suppl. 1: 33 - 49 (1959)

- 17) Wakil, S.T., J. Am. Chem. Soc. 80, 6465 (1958)
- 18) Brady, R.O., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. 44,
993 - 998 (1958)
- 19) Srere, P.A., Bhaduri, A., Biochim. Biophys. Acta
(Amst.) 59, 487 - 489 (1962)
- 20) Spencer, A.F., Löwenstein, J.M., J. biol. Chem.
237, 3640 - 3648 (1962)
- 21) Srere, P.A., Nature 205, 766 - 770 (1965)
- 22) Srere, P.A., in B. L. Horecker und E.R. Stadtman (eds.),
Current topics in cellular regulation, vol. 5,
229 - 283, New York: Academic Press 1972
- 23) Halperin, M.L., Robinson, B.H., Fritz, I.B., Proc.
nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 1003 - 1007 (1972)
- 24) Kornacker, M.S., Löwenstein, J.M., Biochem. J. 94,
209 - 215 (1965)
- 25) Kornacker, M.S., Ball, E.G., Proc. nat. Acad. Sci.
(Wash.) 54, 899 - 904 (1965)
- 26) Suzuki, F., Fukunishi, K., Daikuhara, Y., Takeda, Y.,
J. Biochem. 62, 170 - 178 (1967)
- 27) Gibson, D.M., Lyons, R.T., Scott, D.F., Muto, Y.,
Advanc. Enzyme Regul. 10, 187 - 204 (1972)
- 28) Kornacker, M.S., Löwenstein, J.M., Biochem. J., 95,
832 - 837 (1965)
- 29) Brown, J., Mc Lean, P., Nature 207, 407 - 408 (1965)
- 30) Shrago, E., Lardy, H.A., J. biol. Chem. 241, 663 -
668 (1966)
- 31) Srere, P.A., Foster, D.W., Biochem. Biophys. Res.
Comm. 26, 556 - 561 (1967)
- 32) Foster, D.W., Srere, P.A., J. biol. Chem. 243, 1926 -
1930 (1968)

- 33) Numa, S., Matsuhashi, M., Lynen, F., Biochem. Z. 334, 203 - 217 (1971)
- 34) Korchak, H.M., Masoro, E.J., Biochim. Biophys. Acta 58, 354 - 356 (1962)
- 35) Allmann, D.W., Gibson, D.M., J. Lipid Res. 6, 51 - 62 (1965)
- 36) Allmann, D.W., Hubbard, D.D., Gibson, D.M., J. Lipid Res. 6, 63 - 74 (1965)
- 37) Saggerson, E.D., Greenbaum, A.L., Biochem. J. 119, 221 - 242 (1970)
- 38) Bortz, W., Abraham, S., Chaikoff, I.L., J. Biol. Chem. 238, 1266 - 1272 (1963)
- 39) Pearce, J. Biochem. J. 109, 702 - 704 (1968)
- 40) Wieland, O., Neufeldt, I., Numa, S., Lynen, F., Biochem. Z. 336, 455 - 459 (1963)
- 41) Numa, S., Nakanishi, S., Hashimoto, T., Iritani, N., Okazaki, T., Vitam. and Horm. 28, 213 - 243 (1970)
- 42) Numa, S., Nakanishi, S., Iritani, N., Proc. Jap. Conf. Biochem. Lipids 11, 235 - 240 (1969)
- 43) Majerus, P.W., Kilburn, E., J. Biol. Chem. 244, 6254 - 6262 (1969)
- 44) Nakanishi, S., Numa, S., Europ. J. Biochem. 16, 161 - 173 (1970)
- 45) Nakanishi, S., Numa, S., Proc. nat. Acad. Sci. 68, 2288 - 2292 (1971)
- 46) Matsuhashi, M., Matsuhashi, S., Numa, S., Lynen, F., Fed. Proc. 21, 288 (1962)
- 47) Lynen, F., Matsuhashi, M., Numa, S., Schweizer, E., in J.K. Grant (ed.), The control of the lipid metabolism p. 43 - 56, London-New York, Academic Press 1963

- 48) Matsuhashi, M., Matsuhashi, S., Lynen, F., Biochem. Z. 340, 263 - 289 (1964)
- 49) Bortz, W.M., Lynen, F., Biochem. Z. 337, 505 - 509 (1963)
- 50) Numa, S., Bortz, W.M., Lynen, F. Advanc. Enzymol. Regul. 3, 407 - 423 (1965)
- 51) Numa, S., Ringelmann, E., Lynen, F., Biochem. Z., 343, 243 - 257 (1965)
- 52) Gregolin, C., Ryder, E., Warner, R.C., Kleinschmidt, A.K., Lane, M.D., Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 56, 1751 - 1758 (1966)
- 53) Hashimoto, T., Isano, H., Iritani, N., Numa, S., Europ. J. Biochem. 24, 128 - 139 (1971)
- 54) Hashimoto, T., Numa, S., Europ. J. Biochem. 18, 319 - 331 (1971)
- 55) Pande, S.V., Khan, R.P., Venkitasubramanian, T.A., Biochim. Biophys. Acta, 84, 239 - 250 (1964)
- 56) Flatt, J.P., Ball, E.G., J. Biol. Chem. 239, 675 - 685 (1964)
- 57) Katz, J., Rognstad, R., J. Biol. Chem. 241, 3600 - 3610 (1966)
- 58) Katz, J., Landau, B.R., Bartsch, G.E., J. Biol. Chem. 241, 727 - 740 (1966)
- 59) Teppermann, H.M., Teppermann, J., Amer. J. Physiol. 206, 357 - 361 (1964)
- 60) Teppermann, J., Teppermann, H.M., Am. J. Physiol. 193, 55 - 64 (1958)
- 61) Fitch, W.M., Chaikoff, I.L., J. Biol. Chem. 235, 554 - 557 (1960)
- 62) Fitch, W.M., Chaikoff, I.L., Biochim. Biophys. Acta 57, 588 - 595 (1962)

- 63) Weber, G., Adv. Enzyme Regul. 1, 1 - 35 (1963)
- 64) Murad, S., Freedland, R.A., Life Sci. (Part II) 4,
527 - 531 (1965)
- 65) Johnson, B.C., Sassoon, H.F., Advanc. Enzym. Regul.
5, 93 - 106 (1967)
- 66) Young, J.W., Am. J. Physiol., 214, 378 - 383 (1968)
- 67) Smith, S., Abraham, S., Arch. Biochem. Biophys. 136,
112 - 121 (1970)
- 68) Lockwood, E.A., Bailey, E., Taylor, C.B., Biochem. J.
118, 115 - 162 (1970)
- 69) Chang, A.Y., Schneider, D.I., Diabetes 20, 71 - 77
(1971)
- 70) Diamant, S., Grin, E., Shafrir, E., Eur. J. Biochem.
26, 553 - 559 (1972)
- 71) Shrago, E., Lardy, H.A., Nordlie, R.S., Foster, D.O.,
J. Biol. Chem. 238, 3188 - 3192 (1963)
- 72) Wise, E.M., Ball, E.G., Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)
52, 1255 - 1263 (1964)
- 73) Young, J.W., Shrago, E., Lardy, H.A., Biochemistry 3,
1687 - 1692 (1964)
- 74) Rudack, D., Chisholm, E.M., Holten, D., J. Biol. Chem.
246, 1249 - 1254 (1971)
- 75) Rudack, D., Gozukara, E.M., Chisholm, E.M., Holten, D.,
Biochim. Biophys. Acta 252, 305 - 313 (1971)
- 76) Schimke, R.T., Doyle, D. Ann. Rev. Biochem. 39,
929 - 976 (1970)
- 77) Gibson, D.M., Hubbard, D.D., Biochim. Biophys. Res.
Comm. 3, 531 - 535 (1960)
- 78) Henning, U., Lynen, F., Wieland, O., Neufeldt, I.,
1 Europäisches Symposium für medizinische Enzymo-
logie, Milano 1960 p. 526 - 531, Basel: S. Karger
1961

- 79) Numa, S., Matsuhashi, M., Lynen, F., Biochem. Z. 334, 203 - 217 (1961)
- 80) Dahlen, J.V., Keenan, A.L., Porter, J.W., Arch. Biochem. Biophys. 124, 51 - 57 (1968)
- 81) Chang, H.C., Seidman, I., Teebor, G., Lane, M.D., Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 682 - 686 (1967)
- 82) Burton, D.N., Collins, J.M., Kennan, A.L., Porter, J.W., J. Biol. Chem. 244, 4510 - 4516 (1969)
- 83) Burton, D.N., Collins, J.M., Porter, J.W., J. Biol. Chem. 244, 1076 - 1077 (1969)
- 84) Tweto, J., Dehlinger, P., Iarrabee, A.R., Biochem. Biophys. Res. Comm. 48, 1371 - 1377 (1972)
- 85) Craig, M.C., Nepokroeff, C.M., Lakshmanan, M.R., Porter, J.W., Arch. Biochem. Biophys. 152, 619 - 630 (1972)
- 86) Nishikori, K., Iritani, N., Numa, S., FEBS Letters 32, 19 - 21 (1973)
- 87) Kamiryo, T., Parthasarathy, S., Numa, S., Proc. nat. Acad. Sci. USA, 73, 386 - 390 (1976)
- 88) Guynn, R.W., Veech, R.L., Methods of Enzymology, Vol. XXXV (lipids), Part B, 312 - 315 (1972)
- 89) Guynn, R.W., Veloso, D., Veech, R.L., J. Biol. Chem. 247, 7325 - 7331 (1972)
- 90) Guynn, R.W., Veloso, D., Harris, R.L., Lawson, J.W.R., Veech, R.L., Biochim. J. 136, 639 - 647 (1973)
- 91) Cook, G.A., Nielsen, R.C., Hawkins, R.A., Mehlman, M.A., Lakshmanan, M.R., Veech, R.L., J. Biol. Chem. 252, 4421 - 4424 (1977)
- 92) Cook, G.A., King, M.T., Veech, R.L., J. Biol. Chem. 253, 2529 - 2531 (1978)

- 93) Wang, T.R., Kaplan, N.O., Stolzenbach, F.E., J. Biol. Chem. 211, 465 (1966)
- 94) Siedel, J., Dissertation, Universität München 1975
- 95) Wakabayashi, K., Lynen, F., unveröffentlicht.
- 96) Seyama, Y., Kasam, T., Yamakawa, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Okuda, S., J. Biochem. 82, 1325 - 1329 (1977)
- 97) Lynen, F., in: Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen. Gem. Tagung der Dt. Ges. f. physiol. Chem. und der österr. Biochem. Ges. Wien, S. 121 - 143 (1962)
- 98) Vogel, G., unveröffentlichte Versuche
- 99) Sumper, M., Riepertinger, C., Lynen, F., FEBS Lett. 5, 45 - 49 (1969)
- 100) Fox, L., pers. Mitteilung
- 101) Wieland, F., Dissertation, Universität München 1978
- 102) Weithmann, K.U., Dissertation, Universität München 1974
- 103) Williamson, D.H., Veloso, D., Ellington, E.V., Krebs, H.A., Biochem. J., 114, 575 - 584 (1969)
- 104) Sumper, M., Dissertation, Universität München 1967
- 105) Oesterheld, D., Dissertation, Universität München 1967
- 106) Hohorst, H.J., Kreutz, F.H., Bücher, Th. Biochem. Z. 332, 18 (1959)
- 107) Faupel, R.P., Seitz, H.J., Tarnowski, W., Thiemann, V., Weiss, Ch., Arch. Biochem Biophys. 148, 509 - 522 (1972)
- 108) Scott, D.F., Potter, V.R., Federation Proceedings, 29, No. 4 (1970)
- 109) Kimura, T., Maji, T., Ashida, K., J. Nutrition, 100, 691 - 697 (1970)

- 110) Wieland, O., in *Advances in Metabolic Disorders*,
Acad. Press, New York, 3, 1 (1968)
- 111) Lockwood, E.A., Bailey, E., Taylor, C.B., *Biochem. J.*
118, 155 - 162 (1970)
- 112) Werk, E.E., Knowless, H.C., *Diabetes* 10, 22 (1961)
- 113) Wieland, O., Neufeldt, I., Numa, S., Lynen, F.,
Biochem. Z., 336, 455 (1963)
- 114) Lequin, H.C., Steyn-Parvé, E.P., *Biochim. Biophys.*
Acta 58, 439 - 448 (1962)
- 115) Chernick, S.S., Chaikoff, I.L., Masoro, E.J., Isaeff,
E., *J. Biol. Chem.* 186, 135 (1950)
- 116) Renold, A.E., Hastings, A.B., Nesbitt, F.B., Ashmore,
J., *J. Biol. Chem.* 213, 135 (1955)
- 117) Allmann, D.W., Hubbard, D.D., Gibson, D.M., *J. Lipid*
Res. 6, 63 - 73 (1965)
- 118) Teppermann, H.M., Teppermann, J. *Diabetes* 7, 478 (1958)
- 119) Teppermann, J., Teppermann, H.M., *Am. J. Physiol.* 200,
1069 (1961)
- 120) Muto, Y., Gibson, D.M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*
38, 9 - 15 (1970)
- 121) Löwenstein, J.M., *Biochem. Soc. Sympo.* 27, 61 (1968)
- 122) Bhaduri, A., Srere, P.A., *Biophys. Acta* 70, 221 (1963)
- 123) Siess, E.A., Brocks, D.G., Wieland, O.H., *FEBS -*
Letters, 69, 265 - 270 (1976)
- 124) Falk, J.L., Samson, H.H., Winger, G., *Science*, 177,
811 - 813 (1972)
- 125) Sumper, M., Riepertinger, C., *Eur. J. Biochem.*, 29,
237 - 248 (1972)

- 126) Kamiryo, T., Numa, S., FEBS-Letters 38, 29 - 32 (1973)
- 127) Kitajima, K., Tashiro, S., Numa, S., Eur. J. Biochem.
54, 373 - 383 (1975)
- 128) Skiba, M., Int. Sug. J., 69, 218 (1967)
- 129) Jacobs, R.A., Sly, W.S., Majerus, P.W., J. Biol. Chem.
248, 1268 (1973)
- 130) Kitajima, K., Tashiro, S., Numa, S., Eur. J. Biochem.
54, 373 - 383 (1975)
- 131) Spiess, J., Dissertation, Universität München 1976
- 132) Ochoa, S., in: Methods Enzym. I (Colowick, S.P.,
Kaplan, N.O., eds.) Academic Press, New York,
688 (1955)
- 133) Buckel, W., Eggerer, H. Biochem. Z., 343, 29 - 43 (1965)
- 134) Eggerer, H. Lynen, F., Biochem. Z., 335, 540 - 547 (1962)
- 135) Ziegenhorn, J., Lynen, F., in: Methoden der enzymatischen
Analyse (Bermeyer, H.U., ed.), 3. Aufl., Verlag
Chemie, Weinheim, 2083 - 2086 (1974)
- 136) Kunitz, M., Simms, H.G., J. gen. Physiol. 11, 641 (1928)
- 137) Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czede, R.,
Carbade, K.H., Meyer-Ahrendt, E., Pfeleiderer, G.,
Z. f. Naturf. 8 b, 555 - 577 (1953)
- 138) Oesterhelt, D., Bauer, H., Lynen, F., Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, 63, 1377 - 1383 (1969)
- 139) Warburg, O., Christian, W., Biochem. Z., 310, 384 -
421 (1942)
- 140) Turner, J.C., Review 6, Amersham Buchler
- 141) Dyer, A., An Introduction to Liquid Scintillation
Counting, Heyden Verlag Rheine (1974)
- 142) Lynen, F., Meth. Enzym. XIV, (Löwenstein, J.M., ed.),
Acad. Press, New York and London, 13 - 33 (1969)

- 143) Schreckenbach, Th., Dissertation, Universität München
1975
- 144) Hess, S., Dissertation, Universität München 1976
- 145) Ziegenhorn, J., Senn, M., Bücher, Th., Clin.
Chemistry, 22, 151 (1976)
- 146) Chemical Abstracts, 73, 66865 (1970)
- 147) Freudenthal, R.J., Keppler, J.A., Cook, C.E., Anal.
Biochem. 51, 632-636 (1973)
- 148) Decker, K., Rössle, M., Kreusch, J., Microbial
production and utilisation of gasses. (Schlegel,
H.E. Herausgeber), Akademie der Wissenschaften,
Göttingen, S. 75 - 83 (1976)
- 149) Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse,
2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, S. 2106
(1970)
- 150) Methoden der enzymatischen Lebensmittelanalytik
1977/78, Boehringer-Mannheim
- 151) Brock, N., Wilk, W., Arzneimittelforschung, 11,
1071 (1961)
- 152) Orme, Th., Schweizer, E., Eur. J. Biochem., 24,
407 - 415 (1975)
- 153) Siess, E.A., Brocks, D.G., Wieland, O.H., Hoppe-
Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 785-798 (1978)
- 154) Hunter, K., Rose, A.H., in: The Yeasts, Vol. 2,
p. 211 (Rose, A.H., Harrison, J.S. eds.),
Academic Press, New York.
- 155) Barth, C., Sladik, M., Decker, K., Biochim. Biophys.
Acta 248, 24-33 (1971)
- 156) Barth, C., Sladek, M., Decker, K.,
Biochim. Biophys. Acta 260, 1-9 (1972)
- 157) Willecke, K., Dissertation, Universität München (1968)
- 158) Seyffert, R., unveröffentlichte Ergebnisse
- 159) Fox, L., persönliche Mitteilung.

7. Lebenslauf

Name : Ernst-Christoph Foerster

Geburtsdatum : 9. April 1952

Geburtsort : Santiago de Chile

Eltern : Ernst Foerster, Kaufmann

Jutta Foerster, geb. Wohlgemuth

Schulen

1958 - 1962 : Volksschule Partenkirchen

1962 - 1971 : Werdenfelsgymnasium Garmisch-Partenkirchen
(humanistischer Zweig)

Universität

1971 - 1976 : Studium der Chemie an der Universität
München, Diplomhauptprüfung

Juni 1976 -

November 1978: Anfertigung der vorliegenden Diplom-
und Dissertationsarbeit am Max-Planck-
Institut für Biochemie in Martinsried
unter Anleitung von Professor Dr. F. Lynen.

15. November 1978

